

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Zentrum der Chirurgie
Schwerpunkt Gefäß- und Endovascularchirurgie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. A. Moritz

**Die mRNA-Expression von basic Fibroblast Growth Factor und
Proliferation glatter Gefäßmuskel- und Endothelzellen nach
Photodynamischer Therapie von extrazellulärer Matrix**

**Implikationen für den Wirkmechanismus einer photodynamischen
Hemmung von Intimahyperplasie**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Till Scholz
aus Hüttental

Frankfurt am Main, 2003

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. T. Schmitz-Rixen

Koreferent: Prof. Dr. F. Zanella

Tag der mündlichen Prüfung 22.06.2004

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Zentrum der Chirurgie Schwerpunkt Gefäß- und Endovascularchirurgie der Johann Wolfgang Goethe-Universität und in Kollaboration mit der Medizinischen Klinik I der Universität zu Köln unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Thomas Schmitz-Rixen und Anleitung durch PD Dr. med. Farzin Adili angefertigt. Herrn Prof. Dr. med. Thomas Schmitz-Rixen möchte ich für die Überlassung des Themas herzlich danken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Farzin Adili, der diese Arbeit in die Wege leitete und durch konstruktive Ideen und menschliche Unterstützung entscheidend zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Allen Mitarbeitern des Labors der Medizinischen Klinik I danke ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen. Ohne den Enthusiasmus des sympathischen Teams und der exzellenten Betreuung mit ständiger Diskussionsbereitschaft wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Besonderen Dank gilt Ingrid Karalus, Dr. Stefan Barth, Dr. Alexander Klimka und Dr. Thomas Pfitzner für Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft, technische sowie menschliche Unterstützung und Diskussionsfreudigkeit.

Als Weggenossen gilt zudem mein Dank Sebastian Gathmann und Michael Strohe, die durch ihre aufheiternde Art wesentlich zur guten Stimmung und Zusammenarbeit beigetragen haben.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung und bei Annic Weyersberg bedanken, die mich offenen Ohres auch durch kritische Situationen begleitet hat.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Klinische Problematik	1
1.2 Pathomechanismen der Restenoseentstehung	2
1.2.1 Intimahyperplasie	2
1.2.2 Remodeling	5
1.3 Therapeutische Ansätze	7
1.4 Photodynamische Therapie	8
1.5 Zielsetzung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Zelllinien	13
2.1.1 Gewinnung und Kultivierung von bovinen aortalen Endothelzellen	13
2.1.2 Gewinnung und Kultivierung von bovinen aortalen glatten Muskelzellen	14
2.2 Charakterisierung der Zelllinien	14
2.2.1 Charakterisierung der Endothelzellen	14
2.2.2 Charakterisierung der glatten Muskelzellen	15
2.3 Zellzahlbestimmung	16
2.4 Herstellung von extrazellulärer Matrix	16
2.5 Photodynamische Therapie	17
2.5.1 Grundlagen der Methode	17
2.5.2 Photodynamische Therapie von extrazellulärer Matrix	19
2.6 Bestimmung der Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen nach Photodynamischer Therapie von extrazellulärer Matrix	21
2.7 mRNA-Extraktion nach Roche (mRNA Isolation Kit)	21
2.8 Erststrang cDNA-Synthese nach Pharmacia (First-Strand cDNA Synthesis Kit)	22
2.9 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (LightCycler™)	23
2.9.1 Grundlagen der Methode	23
2.9.2 Quantitative PCR für bFGF	26
2.9.3 Design der mRNA Expressionsuntersuchung	28
2.10 Agarose-Gelelektrophorese	28
2.11 DNA-Gelextraktion nach Qiagen	29
2.12 Big-Dye Terminator Sequenzierkit und ABI-PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer)	29
2.13 Statistik	30

3	Ergebnisse	31
3.1	Charakterisierung der Zelllinien	31
3.1.1	Charakterisierung der Endothelzellen	31
3.1.2	Charakterisierung der glatten Muskelzellen	33
3.2	Bestimmung der Proliferation	35
3.2.1	Bestimmung der Proliferation von Endothelzellen	35
3.2.2	Bestimmung der Proliferation von glatten Muskelzellen	39
3.3	Quantitative Polymerasekettenreaktion (LightCycler™)	42
3.3.1	Optimierung der Quantitativen Polymerasekettenreaktion	42
3.3.2	Sequenzierung von β -Actin und bFGF	44
3.3.3	Verdünnungsreihe von β -Actin	44
3.3.4	Bestimmung der bFGF mRNA Expression	45
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	52
4	Diskussion	53
4.1	Diskussion des Versuchsaufbaus	53
4.1.1	Zellkulturbedingungen	53
4.1.2	Extrazelluläre Matrix von Endothelzellen	54
4.1.3	Basic Fibroblast Growth Factor	55
4.1.4	Versuchszeitpunkte	57
4.1.5	Photosensitizer CASPc	58
4.1.6	mRNA- Isolation	60
4.1.7	LightCycler™	60
4.2	Bedeutung von bFGF für EC Funktionen nach PDT von ECM	62
4.2.1	Bestimmung der Proliferation von Endothelzellen nach Photodynamischer Therapie von extrazellulärer Matrix	62
4.2.2	Bestimmung der bFGF mRNA Expression von Endothelzellen nach Photodynamischer Therapie von extrazellulärer Matrix	65
4.3	Bedeutung von bFGF für SMC Funktionen nach PDT von ECM	68
4.3.1	Bestimmung der Proliferation von glatten Muskelzellen nach Photodynamischer Therapie von extrazellulärer Matrix	68
4.3.2	Bestimmung der bFGF mRNA Expression von glatten Muskelzellen nach Photodynamischer Therapie von extrazellulärer Matrix	69
4.3.3	Konsequenzen für die in-vivo Situation	72
5	Zusammenfassung	73
6	Summary	75
7	Literaturverzeichnis	77
8	Teilpublikationen	90

bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
bp	Basenpaare
CASPc	Chloraluminium sulfoniertes Phthalocyanin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DiI- Ac- LDL	Acetyliertes Low Density Lipoprotein markiert mit 1,1β-Dioacetyl-3,3,3β,3β-Tetramethyl-Indocarbocyanin Perchlorat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT	Zellen auf ECM, die nur dem CASPc ausgesetzt war
DTT	Dithiotreitol
EC	Endothelzellen
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat Isomer I
Gy	Gray
HpD	Hematoporphyrinderivat
IH	Intimahyperplasie
k	Kilo
KO	Gruppenbezeichnung für Zellen auf unbehandelter ECM
LO	Gruppenbezeichnung für Zellen auf ECM, die nur dem Laserlicht ausgesetzt wurde
MMP	Matrix- Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NO	Stickstoff
O ₂	Sauerstoff
¹ O ₂	Singlet-Sauerstoff
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PDT	Photodynamische Therapie bzw. Gruppenbezeichnung für Zellen auf PDT- behandelter ECM

PL	Gruppenbezeichnung für Zellen auf 6-Loch-Platten ohne Anwesenheit von ECM
r	Korrelationskoeffizient
RT-PCR	reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung des Mittelwertes
SMC	Glatte Muskelzellen
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TGF β_1	Transforming Growth Factor- β_1

1 Einleitung

1.1 Klinische Problematik

1999 wurde in Deutschland nahezu jeder zweite Tod (47,8%; 404.900 Menschen) durch eine Erkrankung des Herzkreislaufsystems verursacht [Statistisches Bundesamt]. Diese Erkrankungen werden im Wesentlichen durch eine Verkalkung der Gefäßwand (Arteriosklerose) verursacht. Die Arteriosklerose bedingt eine Einengung (Stenose) oder den Verschuß der Blutgefäße. In vielen Fällen bleibt nur die Aufdehnung (Angioplastie), Ausschälung (Thromendarteriektomie) oder die Überbrückung (Bypass). Invasive Interventionen am Gefäßsystem wie die Ballonangioplastie, Artherektomie, Stentimplantation und Bypasschirurgie gehören zum Standardinstrumentarium der Behandlung von Stenosen in Arterien und Venen. Diese Techniken führen jedoch auch zu einer zusätzlichen Schädigung der Gefäßwand. Durch diese Schädigung kann es zu erneuten Einengung des Gefäßdurchmessers (Restenose) kommen. Restenose wird als Einengung des Gefäßdurchmessers definiert, die am Ort einer zuvor bestehenden Stenose nach Gefäßrekonstruktion bzw. Intervention innerhalb von 6-12 Monaten entsteht [Geary et al., 1998]. Bei 30 bis 50% der Patienten kommt es nach Koronarangioplastie bzw. Angioplastie peripherer Gefäße innerhalb eines Jahres zur Ausbildung von hämodynamisch signifikanten Restenosen [McBride et al., 1988; Popma et al., 1991]. Nach Bypassoperationen in der iliacalen bzw. femoropoplitealen Gefäßstrombahn werden nach einem Jahr Restenosen bei 20-40% der behandelten Patienten beobachtet [Taylor et al., 1990].

Hierbei werden neben dem elastischen Zurückfedern des Gefäßes (Elastic Recoil) und der Thrombose zwei Schlüsselereignisse für die Entwicklung von Restenosen verantwortlich gemacht: Intimahyperplasie (IH) und Remodeling.

1.2 Pathomechanismen der Restenoseentstehung

1.2.1 Intimahyperplasie

Intimahyperplasie ist eine strukturelle Veränderung, die in verletzten Arterien, Venen und Bypassprothesen auftritt [Chervu et al., 1990; Ip et al., 1990]. Hierbei proliferieren Zellen der Gefäßwand, wandern in das Gefäßlumen ein und synthetisieren eine extrazelluläre Matrix (ECM) (*Abb.1*).

Im Jahre 1906 wurde IH das erste Mal von Carrel und Guthrie [Carrel et al., 1906] beschrieben, die einige Tage nach Bypassoperationen eine glänzende Schicht über dem Nahtmaterial der Anastomose bemerkten, die in ihrer Erscheinung ähnlich dem normalen Endothel war. Seit dieser Zeit setzten sich viele Arbeitsgruppen mit dieser Veränderung auseinander, die später "Intimahyperplasie" genannt wurde. Erst 1971 wurde IH als eigentliche Ursache des späten Gefäßverschlusses in aortocoronaren Venenbypässen beschrieben [Grondin et al., 1971].

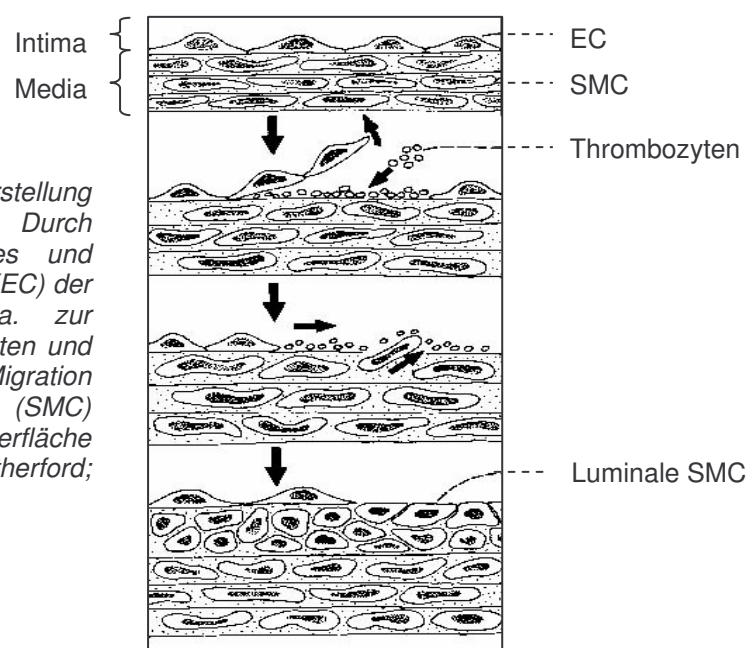
Wird das Endothel verletzt führt das zur Adhäsion von Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten und Neutrophilen an der verletzten luminalen Oberfläche [Wilentz et al., 1987; Clowes et al., 1983; Groves et al., 1979]. In unverletzten Gefäßen liegt die Wachstumsrate bei ca. 1% der glatten Muskelzellen (SMC), die sich in der Mitte der Gefäßwand befinden (Media). Das Wachstum (Proliferation) erhöht sich im Tierexperiment bis über 20% innerhalb der ersten 48h nach Verletzung des Gefäßes [Clowes et al., 1983; Clowes et al., 1985; Hanke et al., 1990]. Die Proliferation normalisiert sich etwa vier Wochen nach Verletzung. Etwa 30% der SMC werden aktiviert (beginnen mit der DNA-Synthese), dedifferenzieren sich von einem kontraktilen Phänotypen (physiologisch funktionelle Form, die u.a. für den Gefäßmuskeltonus zuständig ist) zu einem synthetisierenden Phänotypen, d.h. produzieren ECM und beginnen sich zu teilen [Clowes et al., 1988]. Am achten Tag nach Verletzung kann man SMC auf der luminalen Seite der Lamina elastica interna erkennen, woraus sich schließen läßt, daß sie durch die Fensterung der Lamina gewandert (migriert) sind [Clowes et al., 1990; Reidy et al., 1985; Grunwald et al., 1984]. Das Maximum der Anzahl von SMC ist etwa nach zwei Wochen erreicht, wobei ca. 30% der SMC von der Media zur Intima ausgewandert sind [Clowes et al., 1985].

Die Migration der SMC ist sehr stark zur Intima gerichtet, was auf den Einfluß von chemotaktischen Faktoren, wie z.B. Platelet-derived Growth Factor (PDGF) schließen läßt [Koyama et al., 1993].

Die Proliferation der Zellen während der ersten 72h wird im wesentlichen durch basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), welches von toten und verletzten Zellen freigesetzt wird, vermittelt. Durch bFGF-Antikörper können 80-90% dieser Proliferation verhindert werden, wobei diese nur innerhalb der ersten 72 Stunden nach Gefäßverletzung wirksam sind [Lindner et al., 1990; Lindner et al., 1991; Edelmann et al., 1992; Edelmann et al., 1993].

Nahezu 50% der in die Intima eingewanderten SMC beginnen etwa am siebten Tag mit einer zweiten Proliferationsphase, welche wahrscheinlich durch autokrine (Wirkung von zelleigenen Proteinen, die sich an produzierenden Zellen entfalten) und parakrine Faktoren (Wirkung von Proteinen, die sich an benachbarten Zellen entfalten) vermittelt wird [Davies und Hagen, 1994]. Die Dauer dieser Proliferationsphase und damit das Ausmaß IH ist von der Reendothelialisierung durch Endothelzellen (EC) abhängig. Im Tierexperiment zeigte sich, daß die Proliferation von SMC an den Stellen zum Stillstand kommt, die mit EC bedeckt sind. An Stellen, die noch nicht reendothelialisiert sind, zögert sich diese Phase hinaus (vier Wochen bzw. 12 Wochen) [Clowes et al., 1989]. Sowohl die Dauer mit der sich die Reendothelialisierung vollzieht, wie auch die Fläche, die mit EC besiedelt wird, hat somit eine große Bedeutung für das Ausmaß der IH [Asahara et al., 1995].

Abb.1 Schematische Darstellung von Intimahyperplasie. Durch Verletzung des Gefäßes und damit der Endothelzellen (EC) der Intima kommt es u.a. zur Adhäsion von Thrombozyten und zur Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen (SMC) zur luminalen Oberfläche (modifiziert nach Rutherford; 1999).



In der Entwicklung der IH werden aus Tierexperimenten drei Phasen kategorisiert (Tab.1):

Phase	Gefäßlumen	Gefäßwand
Hyperakut (Minuten bis Stunden)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ EC Verletzung ➤ Thrombozyten Anlagerung ➤ Freisetzung von Wachstumsfaktoren (z.B. bFGF) durch EC 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ SMC Verletzung ➤ Aktivierung von SMC ➤ Expression Protoonkogenen ➤ Freisetzung von Wachstumsfaktoren (z.B. bFGF) durch SMC und (Myo-) fibroblasten
Akut (Stunden bis Wochen)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Organisation des Thrombus ➤ Einwachsen von EC ➤ Freisetzung von Wachstumsfaktoren (z.B. bFGF) durch EC 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Replikation der SMC ➤ Migration der SMC ➤ Infiltration von Leukozyten ➤ Synthese von Wachstumsfaktoren (z.B. bFGF, PDGF) und Inhibitoren (z.B. TGFβ₁) durch SMC und (Myo-) fibroblasten
Chronisch (Wochen bis Monate)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Reendothelialisierung 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Proliferation der SMC ➤ ECM-Synthese der SMC ➤ Umbau der ECM ➤ Synthese von Wachstumsinhibitoren (z.B. TGFβ₁) durch SMC und (Myo-) fibroblasten

Tab.1 Phasen der Entwicklung der Intimahyperplasie (modifiziert nach Davies und Hagen; 1994)

1.2.2 Remodeling

Neben dem Einfluß von IH auf die Pathogenese der Restenoseentstehung, wird dem Prozeß des Remodeling große Bedeutung zugeschrieben. Remodeling wird als Größenveränderung einer Arterie in einem bestimmten Zeitraum definiert und wird histopathologisch als Fläche, die durch die Lamina elastica externa (Lee) gebildet wird, gemessen [Schwartz et al., 1998]. Dabei berücksichtigt Remodeling die Beziehung zwischen arterieller Lumengröße (Lumen), der Plaque- (Plaque) und neointimaler Größe (IH) und der Größenveränderung des Durchmessers eines Gefäßes selbst. Diese Parameter können in folgende Beziehung gebracht werden [Schwartz et al., 1998]:

$$\text{Fläche}_{\text{Lee}} = \text{Fläche}_{\text{Plaque + Media}} + \text{Fläche}_{\text{IH}} + \text{Fläche}_{\text{Lumen}}$$

Da Veränderungen der Fläche_{Lee} per definitionem als Remodeling bezeichnet werden und die Fläche von Plaque und Media konstant bleiben, kann hieraus abgeleitet werden:

$$\text{Remodeling} = \text{Lumenveränderung} - \text{Fläche}_{\text{IH}}$$

Da Arterien in der Lage sind ihren Gefäßdurchmesser sowohl zu vergrößern, als auch zu verkleinern, wird Remodeling in folgende Formen unterteilt [Schwartz et al., 1998]: „*Perfect Remodeling*“, „*No Remodeling*“, „*Favorable Remodeling*“ und „*Unfavorable Remodeling*“ (Abb.2).

Von Perfect Remodeling wird gesprochen, wenn sich das Gefäß um die gleiche oder um eine größere Fläche erweitert, wie es durch IH abgenommen hat und dadurch das neointimale Wachstum vollständig ausgleicht. Die Lumengröße bleibt somit unverändert und es entsteht keine Stenose bzw. Restenose.

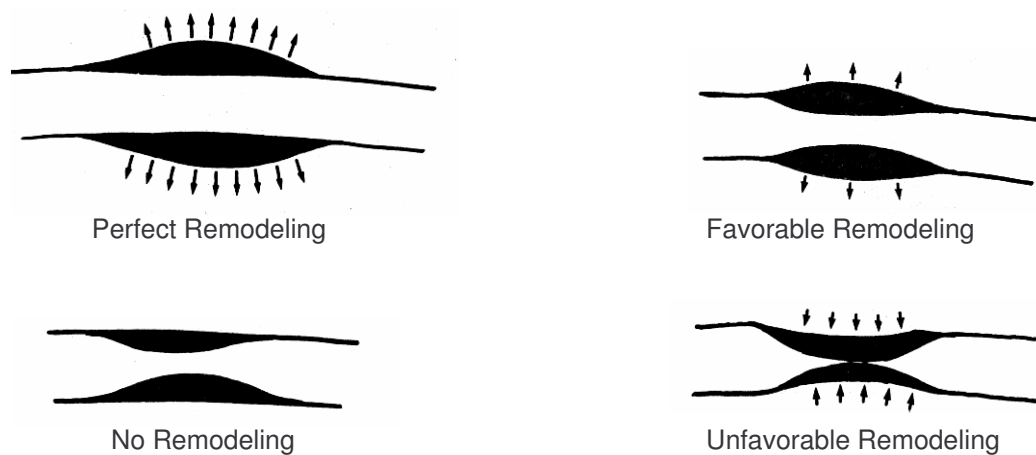
Bei dem Favorable Remodeling weitet sich das Gefäß nur teilweise, wodurch die IH nur teilweise kompensiert wird. Obwohl hierbei durch IH das Lumen eingeengt wird, entsteht durch die kompensatorische Gefäßerweiterung nur eine geringe Stenose bzw. Restenose.

Unfavorable Remodeling entsteht, wenn ein Gefäß, in dem sich IH entwickelt, seine Größe nicht ändert oder wenn es seinen Umfang verringert. Verändert sich die Gefäßgröße nicht, wird das Gefäßlumen durch IH eingeengt. Kontrahiert sich das

Gefäß, wird das Gefäßlumen nicht nur durch die IH eingeengt, sondern zusätzlich durch die Gefäßkonstriktion.

Beim Remodeling besteht ein breites Spektrum zwischen Gefäßvergrößerung als einem und Gefäßkonstriktion als anderem Extrem. Jede Gefäßgröße kann sich zwischen diesen beiden Extremen entwickeln. Remodeling ist also ein kontinuierlicher variabler Prozeß, welcher entweder einen nützlichen oder schädlichen Effekt für das Gefäßlumen hat.

Abb.2 Schematische Darstellung von Perfect Remodeling, Favorable Remodeling, No Remodeling und Unfavorable Remodeling. Perfect Remodeling tritt auf, wenn das Lumen nicht



eingeeengt wird. Beim Perfekt Remodeling expandiert die Arterie und gleicht die IH hierdurch vollständig aus. Es entsteht keine Stenose. Beim Favorable Remodeling expandiert die Arterie nur teilweise, wodurch die IH nicht vollständig ausgeglichen wird und somit eine leichte Stenose resultiert. Vom Unfavorable Remodeling wird gesprochen, wenn die Arterie nicht expandieren kann oder wenn sie sich zusammen zieht (modifiziert nach Schwartz et al., 1998)

1.3 Therapeutische Ansätze

Da gegenwärtig lediglich die mechanische Entfernung von Stenosen bzw. eine Überbrückung mittels Stents oder Gefäßprothesen Eingang in die klinische Routine gefunden haben, wird derzeit mit Nachdruck an wirksamen und gewebeschonenden Methoden zur Prävention und Therapie von IH in Blutgefäßen gearbeitet. Verschiedene pharmakologische Substanzen (z.B. Heparin, Kalziumantagonisten, Eicosapentanoide, Stickstoffdonatoren [Clowes et al., 1991], Statine [Constantinescu et al., 1992; Gellman et al., 1991; Weintraub et al., 1994], Wachstumsfaktor-Inhibitoren wie Trapidil [Liu et al., 1990] und Angiopeptin [Emanuelsson et al., 1995], ACE-Hemmer [MERCATOR study group, 1992; MARCATOR study group, 1995]), Antikörper gegen Wachstumsfaktoren, wie bFGF [Lindner et al., 1991], Transforming Growth Factor- β (TGF β) [Wolf et al., 1994], PDGF [Ferns et al., 1991] sowie die genetische Beeinflussung der Effektorzellen der IH [Leclerc et al., 1992; Lee et al., 1993] werden in Zellkulturen bzw. tierexperimentell evaluiert.

Die Radiatio mit ionisierender Strahlung wird seit einiger Zeit klinisch erprobt [Waksman; 2001]. Die Auswirkungen des mutagenen Potentials, die eine Therapie mit ionisierender Strahlung mit sich bringt, wurden dabei bisher nicht evaluiert. Bei diesem Verfahren werden freie Radikale produziert. Durch die Radikale werden Nukleinsäuren der Zellen fragmentiert bzw. Mikrotubuli zerstört, die für die Mitose der Zellen wichtig sind. Damit wird gezielt die Zellteilung behindert. Da IH eine fibroproliferative Reaktion auf eine Gefäßverletzung ist und sich ionisierende Strahlung als effektive Therapie gegen fibroproliferative Prozesse herausstellte [van Leeuwen et al., 1998], wurde ionisierende Radiatio als Mittel gegen die Entwicklung von Restenosen untersucht [Teirstein et al., 1997]. Es zeigte sich, daß ionisierende Radiatio experimentelle IH hemmt und einige klinische Versuche stellten sich als vielversprechend heraus [Waksman; 2001]. Eine in-vitro Studie zeigte, daß durch ionisierende Strahlung dabei die Gefäßzellen lediglich in einen Wachstumsstillstand versetzt werden, der aber grundsätzlich reversibel ist und somit zu folgenden Fibrosierungen und erneuten Gefäßverengungen führen könnte [Heckenkamp et al., 1999]. Weiter zeigte diese Studie, daß die Radiatio in der eingesetzten therapeutischen Dosierung von 10-20Gy keinen nachweisbaren Effekt auf die ECM oder ihre Inhalte hat. Die ECM enthält eine Reihe von Wachstumsfaktoren, wie bFGF, TGF β_1 und

PDGF, welche adventitielle Zellen zu Proliferation und Migration stimulieren können. Verstärken kann sich dieser Prozeß, wenn Zellen durch ionisierende Strahlung zerstört werden und zuvor in der Zelle befindliche Wachstumsfaktoren in die Umgebung freigesetzt werden. Hierdurch kann es zu Entzündungsreaktionen kommen und folglich zu erneuten stenotischen Prozessen. Eine klinische Multicenter- Studie (252 Patienten) hat gezeigt, daß es nach intracoronarer Bestrahlung mit Iridium-192 zu einer höheren Rate von Thrombosen und damit zu Myocardinfarkten kam als bei Patienten, die keine Bestrahlung erhielten [Leon et al., 2001]. Der Nachteil an diesem Verfahren liegt also darin, daß Entzündungsprozesse nicht verhindert sondern eher noch verstärkt werden und es folglich zu erneuten Gefäßverengungen kommen kann.

1.4 Photodynamische Therapie

Ein weiteres vielversprechendes Verfahren, daß ebenfalls seine Wirkung über freie Radikale ausübt, ist die photodynamische Therapie (PDT). Dabei wird ein biologisch zunächst inerte Farbstoff (Photosensitizer) durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht einer bestimmten Wellenlänge aktiviert, wodurch Radikale entstehen, die in biologischen Systemen hoch reaktiv sind (näheres siehe Material und Methoden).

PDT ist sehr selektiv, da Radikale nur dort produziert werden, wo die Bestrahlung stattfindet und diese eine extrem kurze Halbwertszeit (ns bis ms) und Diffusionsdistanz aufweisen, was zusammengekommen in einem lokalisierten Effekt resultiert. Hinzu kommt, daß der Photosensitizer in proliferierenden Zellen bevorzugt akkumuliert und das Laserlicht die Möglichkeit bietet, das betroffene Gebiet zu bestrahlen. Aus diesen Gründen erscheint PDT als Therapie gegen verschiedene maligne Erkrankungen attraktiv und ist im klinischen Gebrauch gegen Tumoren der Haut, im endobronchialen, ösophagealen, gastrointestinalen, genitourinalen und gynäkologischen Bereich sowie im Gebiet der HNO [Pass et al., 1993]. PDT wird außerdem gegen andere nicht maligne zelluläre proliferative Störungen, wie Psoriasis [Calzavara-Pinton et al., 1996], Arthritis [Trauner et al., 1996], Keloid [Wolfort et al., 1996] und in klinischen Studien gegen IH eingesetzt [Jenkins et al., 1999; Rockson et al., 2000].

Die Idee, PDT als Therapieform gegen Restenosen einzusetzen, entstand aus der Überlegung, daß durch die lokale Eradikation von Zellen an der Stelle des geschädigten Gefäßes die Effektorzellen (SMC und Myofibroblasten) der IH eliminiert werden könnten. 1992 wurde die erste Arbeit über PDT als Methode zur Behandlung von

experimenteller IH publiziert [Ortu et al., 1992]. Diese Studie konzentrierte sich auf die akuten Effekte von PDT auf die Gefäßwand. Um IH zu induzieren, wurde das standardisierte Ballonverletzungsmodell an der Rattencarotis eingesetzt. Hierbei wird die Arteria carotis communis durch einen geblockten, über die Arteria carotis externa eingeführten, Fogarty-Embolektomie Katheter verletzt, wodurch sich innerhalb von vier Wochen IH entwickelt. PDT der Arterien wurde mit dem Photosensitizer Chloraluminium sulfoniertes Phthalocyanin (CASPc) am zweiten und siebten Tag nach Ballonverletzung durchgeführt. Das verletzte Gefäß wurde extern mit einem Laser mit einer Energie von 100 J/cm^2 bestrahlt. Die bestrahlten Gefäßsegmente zeigten eine signifikante Verminderung der IH nach 14 Tagen, wobei keine SMC und Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten) in dem bestrahlten Gebiet nachzuweisen waren. Elektronenmikroskopische Analysen zeigten einen durch PDT ausgelösten zytotoxischen Effekt nach vier Stunden, ohne strukturelle Veränderungen von Kollagen oder elastischen Fasern und nur wenige Thrombozyten auf der intimalen Oberfläche. Es zeigte sich, daß die PDT induzierte SMC Eradikation ein effektives Mittel war, die für IH verantwortlichen Effektorzellen lokal zu eliminieren ohne Thrombosen, Entzündungen oder den strukturellen Verlust der Gefäßwand zu verursachen.

Anschließende Experimente, die sich mit der Pharmakodynamik des Photosensitizers CASPc auseinandersetzten zeigten, daß sich der Farbstoff bevorzugt an proliferierende Zellen der Gefäßwand bindet [LaMuraglia et al., 1993]. Diese Analysen zeigten weiter, daß im Vergleich zu verletzten Gefäßen annähernd 60% weniger CASPc in normalem arteriellen Gewebe aufgenommen und zurückgehalten wurde. Diese Daten weisen darauf hin, daß es möglich ist in verletzten Gefäßen und in Abschnitten, in denen sich IH gebildet hat, eine erhöhte Ansammlung und Retention von Photosensitizern im Vergleich zu unverletzten Arterien zu erzielen. Da IH durch proliferierende Zellen ausgelöst wird kann PDT so gezielt gegen die Effektorzellen eingesetzt werden.

Diesen vielversprechenden Ergebnissen folgte eine Studie über den Langzeiteffekt (bis 16 Wochen) von PDT auf verletzte Gefäße [LaMuraglia et al., 1994]. Die PDT-behandelten Arterien, zeigten eine vollständige Reendothelialisierung der Intima nach vier Wochen und die Repopulation der Adventitia durch (Myo)fibroblasten von der ersten bis zur 16. Woche. Nach 16 Wochen wurde nur eine minimale Repopulation in der Media und Intima von SMC in PDT-behandelten Arterien nachgewiesen. Im Vergleich zu ballonverletzten, nicht PDT-behandelten Arterien, die als Kontrolle

dienten, wiesen die PDT-behandelten Arterien keinerlei Gefäßverengungen oder -erweiterungen im untersuchten Zeitraum auf, was für die Erhaltung der strukturellen Integrität des behandelten Gefäßes spricht.

Da die vollständige Reendothelialisierung bei minimaler Repopulation der Media nicht allein durch cytotoxische PDT- Effekte zu erklären war, wurden die Auswirkungen von photodynamisch-behandelter ECM auf Zellen untersucht. Hierbei stellte sich heraus, daß einer der wichtigsten Effekte von PDT die Modulation der ECM ist. So zeigte eine Studie [Adili et al., 1996], daß durch PDT von isolierter extrazellulärer Matrix in vitro das Anheften, die Migration und die Proliferation glatter Muskelzellen signifikant vermindert wird. Demgegenüber werden Proliferation und Migration von EC auf PDT-behandelter ECM signifikant gesteigert. Das Anheftungsverhalten der EC bleibt hierbei unbeeinträchtigt. Eine Reihe von Experimenten untersuchten daraufhin die Wirkung von PDT auf die Funktion von EC und SMC [van Eps et al. 1997a; van Eps et al., 1997b; van Eps et al., 1997c; van Eps et al., 1999]. Die Faktoren, die für die Funktion von EC und SMC einen wesentlichen Einfluß haben stellen hierbei bFGF, TGF- β_1 und PDGF dar. Das übereinstimmende Resultat dieser Versuche war, daß PDT, neben der Cytotoxizität, biologisch-aktive Proteine, wie zelluläres bFGF nach PDT von SMC [van Eps et al., 1997c] und matrix-assoziiertes TGF- β_1 nach PDT der ECM [van Eps et al. 1997a], aber auch zelluläres TGF- β_1 nach PDT von SMC [van Eps et al., 1997b], und PDGF inaktivieren kann [van Eps et al., 1999]. Diese Polypeptide werden nach Gefäßverletzungen freigesetzt und aktiviert und haben einen regulierenden Einfluß auf den Heilungsprozeß. Ein Ungleichgewicht dieser Mediatoren während des Heilungsprozesses wird als einer der Hauptverursacher der IH angesehen [Wolf et al., 1994; Lindner et al., 1991].

Wie sich die PDT-induzierten Veränderungen der ECM auf intrazelluläre Mechanismen (Protein- und mRNA- Expression) auswirken, konnte bisher nicht geklärt werden.

- **Vollständige Inhibierung von IH**
- **Komplette Reendothelialisierung der behandelten Gefäße**
- **Keine zelluläre Repopularisierung der Media**
- **Zelluläre Repopularisierung der Adventitia**
- **Keine Hinweise für Thrombose und Inflammation**
- **Keine Hinweise für eine strukturelle Desintegration der Gefäßwand**
- **Keine Hinweise für IH in den Übergangszonen**

Tab.2 *Schlüsselbefunde nach PDT von Gefäßen*

1.5 Zielsetzung

Arbeiten untersuchten die Wirkung von PDT auf endotheliale ECM in-vitro und konnten belegen, daß PDT zu einer Alteration der ECM führt und diese zu Veränderungen der Zellfunktionen [Adili et al., 1995 und 1996]. Die Proliferation und Migration der EC und SMC wird im wesentlichen durch den Wachstumsfaktor bFGF vermittelt [Davies und Hagen, 1994]. bFGF ist sowohl Chemokin als auch Mitogen und wird unter anderem von EC und SMC synthetisiert. Durch Verletzung bzw. den Untergang von Zellen wird bFGF in die Umgebung abgegeben, wobei ein wesentlicher Teil von der ECM gebunden wird [Reidy et al., 1992]. Um zunächst aufzuklären, weshalb die Zellfunktionen von SMC auf PDT-behandelter Matrix gehemmt sind, wurde in einer weiteren Versuchsreihe gezeigt, daß bFGF durch PDT direkt inaktiviert wird, und daß die Inaktivierung matrix-gebundenen bFGF's zu den beobachteten Veränderungen führen kann [LaMuraglia et al., 1997]. Die Zellfunktionen von EC auf PDT-behandelter ECM sind demgegenüber gesteigert, obwohl einer der potentesten Wachstumsfaktoren, bFGF, durch PDT aus dem extrazellulären Umfeld inaktiviert wurde. Die Hypothese, die zu der vorliegenden Arbeit führte war, daß der Grund für die konträren Zellfunktionen von EC und SMC in intrazellulären Mechanismen liegen müsse, die durch Zell-Matrix-Interaktionen moduliert werden. Hierzu sollte untersucht werden, ob intrazelluläres bFGF von EC und SMC nach PDT von ECM unterschiedlich exprimiert wird und somit zu Proliferationsveränderungen führt, womit sich folgende Fragestellungen formulieren lassen:

1. Wie beeinflusst Photodynamische Therapie von extrazellulärer Matrix die Proliferation von normalen, unbehandelten Endothelzellen und glatten Muskelzellen in vitro? Lassen sich hieraus Rückschlüsse für die differentielle Repopulation der Gefäßwand in vivo ziehen?
2. Wie beeinflusst Photodynamische Therapie von extrazellulärer Matrix die bFGF mRNA-Expression in normalen, unbehandelten Endothelzellen und glatten Muskelzellen in vitro?

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

2.1.1 Gewinnung und Kultivierung von bovinen aortalen Endothelzellen

Komplette Stücke der Aorta thoracalis von Kälbern wurden unmittelbar nach dem Schlachten vom Eingeweidepaket des Kalbes entnommen und in sterile, isotone, phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, 8g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 1,44g/l Na₂HPO₄, 0,24 g/l KH₂PO₄ pH 7,4; Biochrom, Berlin) verbracht. Nach der Entnahme wurden die Aorten bei 4°C gelagert und innerhalb der nächsten zwei Stunden verarbeitet.

Zunächst wurden die Aortenstücke in 500ml PBS einmal gewaschen. Die Adventitia wurde abpräpariert, die Gefäße wurden längs inzidiert und die Lumenseite mit PBS gewaschen. Die Gewebestücke wurden in sterile Rahmen mit der Lumenseite nach oben eingespannt. Das Lumen wurde anschließend dreimal mit PBS gewaschen und mit 10ml warmer 0,1%iger Kollagenaselösung (Typ I, 290U/mg, in Hanks` balanced salt solution; Sigma, Deisendorf) bedeckt. Die Aortenstücke wurden bei 37°C inkubiert und nach 12min wurden die EC durch sanftes Abschaben mit Stellbring-Haken abgelöst. Die Kollagenaselösung wurde abpipettiert, in ein steriles 50ml Falconröhrchen (Corning, Bodenheim) überführt und fünf Minuten bei 260 x g und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge J6-MC; Beckmann, München). Der Überstand wurde dreimal dekantiert, das Pellet mit je 10ml DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium low glucose; Gibco, Gaithersburg, Maryland, USA) resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurden die EC in 10ml warmen, supplementierten DMEM (20% fötales Kälberserum (FCS), 0,6mol/l L-Glutamin, 200U/200µg Penicillin/Streptomycin, 500U/ml Heparin, 200µg/ml Gentamicin; alles Biochrom, Berlin) in unbeschichtete 100mm Petri-Schalen (Corning, Bodenheim) in Kultur gebracht.

Das Zellkulturmedium wurde am folgenden Tag gegen frisches supplementiertes Medium ausgetauscht, dann zweimal wöchentlich Medium gewechselt. Sobald die Zellen ein konfluentes Monolayer bildeten, wurde die Kultur in 75cm² Falconflaschen (Corning, Bodenheim) subkultiviert (Ratio 1:6) und in 10% FCS, 100U/100µg Penicillin/Streptomycin, ohne Gentamicin und ohne Heparin in DMEM verbracht und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank (Heraeus, Düsseldorf) verwahrt.

2.1.2 Gewinnung und Kultivierung von bovinen aortalen glatten Muskelzellen

Die Gewinnung der Muskelzellen (SMC) erfolgte zeitlich nach der oben beschriebenen Endothelzellentnahme.

Nachdem die Lumenseite mit einem 22er Skalpell (Feather, Köln) ca. 1mm abgeschabt wurde, wurden Mediastücke in einer Größe von etwa 4mm² präpariert und in eine sterile Petri-Schale gegeben. Unter der Sterilbank (LaminAir ELB 2448; Heraeus, Düsseldorf) wurden die Mediastücke mit 10ml warmem, supplementiertem Medium (7,5ml DMEM, 2ml FCS, 120µl L-Glutamin 200mM, 200U/200µg Penicillin/Streptomycin, 1mg Gentamicin) so bedeckt, daß sie sich nicht vom Boden lösten. Anschließend wurden sie im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ verwahrt.

Das Zellkulturmedium wurde nach vier Tagen gegen frisches supplementiertes Medium ausgetauscht, dann zweimal wöchentlich Medium gewechselt. Sobald die Zellen einen Hof von ca. 2mm um die Gewebestücke bildeten, wurden die Mediastücke entfernt. Sobald die Zellen ein konfluentes Monolayer bildeten, wurde die Kultur subkultiviert (Ratio 1:6) und in 10% FCS, 100U/100µg Penicillin/Streptomycin und ohne Gentamicin in DMEM verbracht und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank verwahrt.

2.2 Charakterisierung der Zelllinien

2.2.1 Charakterisierung der Endothelzellen

Die EC wurden mit DiI-Ac-LDL (Acetyliertes Low Density Lipoprotein markiert mit 1,1β-Dioacetyl-3,3,3β,3β-Tetramethyl-Indocarbocyanin Perchlorat); Paesel und Lorie, Hanau) jeweils in der ersten Passage charakterisiert. Dieses Lipoprotein identifiziert spezifisch vaskuläre EC und Makrophagen. Wird DiI-Ac-LDL in eine Zelle aufgenommen, wird das Lipoprotein durch lysosomale Enzyme degradiert und DiI, ein Fluoreszenzfarbstoff, akkumuliert in den intrazellulären Membranen. Makrophagen und EC können durch ihre unterschiedlich starke Markierung unterschieden werden. Fibroblasten, SMC, Pericyten und Epithelzellen reagieren mit diesem Antikörper nicht.

2×10^5 EC in 10%igem supplementiertem Medium wurden in 6-Well-Platten gegeben und drei Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden dreimal mit 2ml PBS für 15min gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 250µl DiI-Ac-LDL Antikörper (10µg/ml in PBS mit 10% FCS) bedeckt und unter Lichtausschluß für 4h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit je 2ml PBS für 5min gewaschen und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Jena) betrachtet und photographiert (Spiegelreflexkamera, Kontax; Diapositivkunstlichtfilm 5018 EPY, Kodak). Um Kontaminationen mit SMC auszuschließen, wurde außerdem die Immunfluoreszenz mit α -Actin Antikörper an EC durchgeführt (Durchführung s.u.).

2.2.2 Charakterisierung der glatten Muskelzellen

Die SMC wurden mit monoklonalen α -Actin Antikörper (Sigma, Deisenhofen), der direkt FITC (Fluoreszein Isothiocyanat Isomer I) konjugiert ist und aus der Maus gewonnen wird, jeweils in der ersten Passage charakterisiert. Dieser Antikörper reagiert spezifisch mit der α -Actin Isoform von glatten Muskelzellen (42kD) und bindet nicht an anderen Actin Isoformen, die z.B. in Fibroblasten oder Epithelzellen vorkommen.

Zur Charakterisierung wurden 2×10^5 SMC in 6-Well-Platten (Corning, Bodenheim) gegeben und mit 10%igem supplementiertem Medium drei Tage bei 37°C und 5% CO₂ verwahrt. Das Medium wurde entfernt und die Zellen dreimal mit 2ml PBS jeweils 15min gewaschen. Die Zellen wurden durch fünfminütiges Inkubieren mit 250µl Formaldehyd (4%; Sigma, Deisenhofen) fixiert und dreimal mit 2ml PBS für jeweils 5min gewaschen. Die Zellen wurden mit 250µl Triton-X 100 (0.1% in PBS; Sigma, Deisenhofen) für 5min bedeckt und nochmals dreimal jeweils 5min mit 2ml PBS gewaschen. Es folgte eine 30minütige lichtgeschützte Inkubation mit 250µl des α -Actin Antikörpers (1:250 in PBS). Danach wurden die Zellen dreimal für 5min mit 2ml PBS gewaschen. Um die Zellkerne anzufärben, wurden die Zellen anschließend mit 250µl Ethidium Bromid (40µg/ml; Merck, Darmstadt) für 15s inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal für 5min mit 2ml PBS gewaschen. Es folgte die Betrachtung mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 25; Zeiss, Jena). Um Kontaminationen mit EC auszuschließen, wurde außerdem die Immunfluoreszenz mit DiI-Ac-LDL Antikörper an SMC durchgeführt (Durchführung s.o.).

2.3 Zellzahlbestimmung

Die in Kulturflaschen gewachsenen Zellen wurden mit 2ml Trypsin/EDTA (0,05/0,02% in PBS ohne $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$; Biochrom, Berlin) abgelöst und nach 10min wurde das Trypsin mit 10ml 5%igem Medium inhibiert. Die Zellsuspension wurde in Falconröhrchen überführt und 5min bei 1000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit 50ml PBS resuspendiert und anschließend 5min bei 1000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 5ml supplementiertem Medium resuspendiert. Hiervon wurden 200 μl mit 600 μl DAPI (Partec, Münster) versetzt und die Zellzahl mit einem Durchflußzytometer (CCA; Partec, Münster) bestimmt. Bei diesem Verfahren wird die DNA der Zellen mit DAPI angefärbt, so daß der DNA-Gehalt der Farbstoffmenge proportional wird. Das CCA-System regt die einzelne Zelle mit einer Wellenlänge von 435nm an und kann so im exakten Probenvolumen jede Zelle, die dieses charakteristische Fluoreszenzsignal aussendet zählen und anhand der Lichtintensität den DNA-Gehalt bestimmen. Um die Zellzahl pro Milliliter zu bestimmen, wurde die errechnete Zellzahl mit 20 multipliziert (200 μl in 1:4 Verdünnung eingesetzt).

2.4 Herstellung von extrazellulärer Matrix

In Anlehnung an die zuvor beschriebene Methode zur Herstellung von extrazellulärer Matrix (ECM) [Adili et al., 1996] wurden 5×10^5 EC (Passage 2-5) in 1,5ml 10%igem supplementierten Medium pro Well auf 6-Well-Platten aufgetragen und 7-8 Tage in Kultur gehalten. Um die EC als Zellrasen abzulösen, wurde 1ml Triton X-100 (200ml Ampuwa, 1ml Triton X-100, 270.5 μl Ammoniumhydroxid) pro Well aufgetragen. Der Zeitpunkt der Ablösung der EC wurde mikroskopisch verfolgt. Die so in den Wells verbliebene ECM wurde dreimal mit 1ml PBS gewaschen.

2.5 Photodynamische Therapie

2.5.1 Grundlagen der Methode

Photochemotherapie wird in der Medizin häufig als Photodynamische Therapie bezeichnet. Der Ausdruck „Photodynamisch“ wird in der Biologie als Bezeichnung für physiochemische Reaktionen verwendet, die in Emulsionen von Photographie- Filmen auftreten. Blum [Blum, 1964] erklärte, daß dieser Ausdruck nur für photochemische Reaktionen verwendet werden sollte, in welchen Sauerstoff verbraucht wird.

PDT ist ein Verfahren, bei dem ein biologisch zunächst inerte Farbstoff (Photosensitizer) nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht einer bestimmten Wellenlänge „photoaktiviert“ wird, d.h. von einem elektrochemisch stabilen Zustand (Grundzustand) zu einem aktiven Zustand umgewandelt wird (Abb.3).

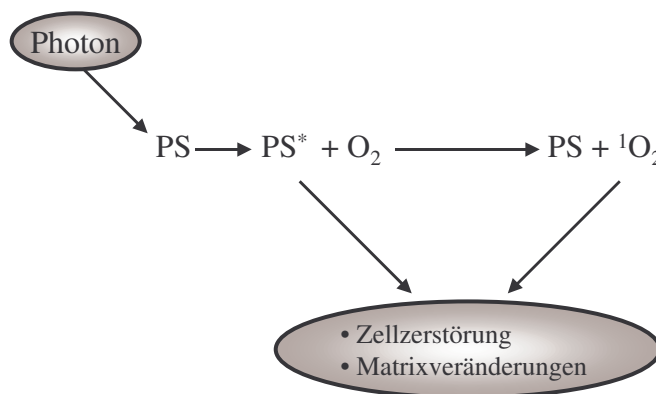


Abb.3 Reaktionsschema des Photosensitizers CASPc. Der Photosensitizer (PS) wird durch Licht einer bestimmten Wellenlänge unter Radikalbildung aktiviert (PS*). In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff (O₂) entsteht in einer weiteren Reaktion hoch reaktiver Singlet-Sauerstoff (¹O₂).

Der Photosensitizer hat die Eigenschaft sich zu einem hohen Prozentsatz in Elektrontriplets zu aktivieren, welche eine Lebensdauer von ns bis ms besitzen. Ausgehend von diesem Zustand folgen einer der beiden Reaktionen [Foote, 1984]:

TypI-Reaktion, in der der Photosensitizer freie Radikale bildet und diese direkt mit anderen Molekülen, wie Aminosäuren, Tryptophan, Cystein oder Farbstoffen, wie Beta-Carotin oder NaN_3 reagieren;

TypII-Reaktion, bei der die Radikale des Farbstoffs in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff (O_2) Elektronen an Sauerstoffmoleküle in der Umgebung abgeben und sie in Sauerstoffradikale (Singlet-Sauerstoff, $^1\text{O}_2$) umwandeln. Diese Sauerstoffradikale sind in biologischen Systemen hoch reaktiv (*Abb.3*) [Henderson et al., 1992]. Dabei hat $^1\text{O}_2$ eine sehr kurze Lebensdauer in biologischen Systemen von unter $0,04\mu\text{s}$ und wirkt deshalb nur im unmittelbaren Umfeld der Entstehung ($< 0,02\mu\text{m}$) [Moan und Berg, 1991].

Die gegenwärtige Ära PDT begann durch Studien von Lipson und Schwartz 1960. Sie beobachteten, daß die Injektion von Hematoporphyrin während Tumor-Operationen neoplastisches Gewebe durch Fluoreszenz sichtbar machte [Dougherty et al., 1998]. Aus Hematoporphyrin wurde der zum klinischen Gebrauch heutzutage weit verbreitete Photosensitizer Photofrin® entwickelt [Dougherty, 1996]. Aufgrund der lang anhaltenden Haut-Phototoxizität von Photofrin wurden verschiedene neue Photosensitizer entwickelt.

Neuere Photosensitizer sind unter der Berücksichtigung des Wirkortes sowohl im Hinblick auf das Gewebe, wie auch auf subzelluläre Strukturen konzipiert. Da die Photosensitizer der zweiten Generation meist reine Zusammensetzungen und keine Mischungen sind, kann der Wirkort oft eindeutig identifiziert werden. Die meisten Photosensitizer sind fluoreszent. Der Bindungsort in Geweben oder Zellen kann somit durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelt werden. Da das cytotoxische Produkt, $^1\text{O}_2$, nach seiner Bildung nur in einem Umfeld von weniger als $0,02\mu\text{m}$ wirkt, spiegelt der Bindungsort des Photosensitizers gleichzeitig den Ort der photoinduzierten Zerstörung wieder. Mitochondrien, Lysosome und Plasma Membrane stellten sich als potentielle PDT Ziele der Cytotoxizität heraus [Henderson et al., 1992]. Die Photoperoxidation von Membrancholesterol und anderen ungesättigten Phospholipiden führt zu Veränderungen der Membranpermeabilität, Verlust von Flüssigkeit, Vernetzung von Amino- und Polypeptiden und Inaktivierung von membranassoziierten Enzymsystemen und Rezeptoren [Girotti, 1990]. Unabhängig von der Lokalisation des Angriffs, ist jedoch, sobald die letale PDT-Dosis erreicht ist, der Verlust der Zellintegrität die Folge. Mit geringeren PDT-Dosen, ist für viele Zellarten auch ein Zelltod durch Apoptose beschrieben [LaMuraglia, 2000].

2.5.2 Photodynamische Therapie von extrazellulärer Matrix

Die PDT von ECM erfolgte in Anlehnung an die etablierte Methode von Adili und Mitarbeitern [Adili et al., 1996].

Als Photosensitizer wurde Chloraluminium sulfoniertes Phthalocyanin (CASPc, Ciba-Geigy, Basel, Schweiz) verwendet. CASPc gehört zu der synthetisch hergestellten Gruppe der Porphyrine [Spikes et al., 1986]. Das Grundgerüst bildet ein Ringsystem aus vier Pyrrolringen, welches mit Aluminium Chelate bildet [Bown et al., 1986]. Die Sulfonierung wird durch Bedampfung des Aluminium- Phthalocyanins mit Schwefelsäure erreicht [Bown et al., 1986]. CASPc ist ein Gemisch aus mono-, di-, tri- und tetra-sulfonierten Formen, die im Mittel über drei Schwefelsäuregruppen pro Molekül verfügen [Bown et al., 1986]. Diese chemisch stabile, einfach herzustellende monomere Form ist direkt in Wasser löslich [Bown et al., 1986]. CASPc ist einer der potentesten und meist verwendeten Photosensitizern der vaskulären PDT. Mit einem Erregungsmaximum bei einer Wellenlänge von 675nm hat das Licht eine hohe Gewebepenetration, was für die Bestrahlung aller Gefäßwandschichten von großer Bedeutung ist [Ortu et al., 1992].

Der Photosensitizer CASPc wurde in einer Konzentration von 1mg/ml in sterilem PBS als Stammlösung angesetzt, sterilfiltriert und in Aliquots bei -70°C gelagert. Aus dieser Lösung wurde für die PDT von ECM eine Arbeitslösung von 5µg/ml hergestellt. Alle Versuche wurden mit der gleichen Stammlösung durchgeführt. Die ECM wurde mit 1ml der Arbeitslösung bedeckt und mit Licht ($100\text{J}/\text{cm}^2$, $100\text{mW}/\text{cm}^2$, $\lambda=675\text{nm}$) eines Diodenlasers (AOC-LM 500-675, Applied Optronics Corp., South Plainfield, New Jersey, USA) bestrahlt (Abb.4). Das Licht wurde über einen Glasfaser-Lichtleiter ($\varnothing 400\mu\text{m}$, AOC DBLF/40, Applied Optronics Corp., South Plainfield, New Jersey, USA) appliziert, an dessen Ende sich eine Streulinse befand. Die Streulinse war so ausgerichtet, daß genau die Fläche eines Wells ($\varnothing 3,5\text{cm}$) homogen bestrahlt wurde (Abb.4). Die Bestrahlungsfluence war mit $100\text{J}/\text{cm}^2$ so gewählt, daß die in vivo therapeutisch wirksame Dosis erreicht wurde [Ortu et al., 1992]. Bei dieser Dosis ist nicht mit thermischen Effekten zu rechnen [Boulnois, 1986]. Um die Leistung von $100\text{mW}/\text{cm}^2$ zu erhalten, wurde je ein Well mit einer Fläche von $9,62\text{cm}^2$ mit einer Laserleistung von 962mW bestrahlt. Jedes Well wurde 1000 Sekunden bestrahlt, um auf eine Energie von $100\text{J}/\text{cm}^2$ zu kommen (Fluence [J/cm^2] = (Leistung [W] x Zeit [s]) / Fläche [cm^2]). Die Bestrahlungsenergie wurde nach jedem einzelnen Well durch ein

Powermeter (Power Meter Lasermate; Coherent, Dieburg) am Ende der Glasfieber (Glasfiber AOC DBLF-40; Applied Optronics Corp., South Plainfield, New Jersey, USA) überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Um weitere Bestrahlung mit Umgebungslicht nach PDT zu verhindern, wurden die Zellkulturplatten mit Aluminium-Folie umhüllt. Die ECM wurde dann je dreimal mit 1,5ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Matrices mit je 2×10^5 suspendierten Zellen (EC bzw. SMC) in 1,5ml 5%igem (für die Proliferationbestimmung) bzw. 0,5%igem (für bFGF mRNA Bestimmungen) supplementierten Medium bedeckt.

Um eventuelle Effekte des Lasers oder des Photosensitizers zu bestimmen, wurde ECM die nur mit dem Laser bestrahlt wurde bzw. ECM die nur dem CASPc ausgesetzt war eingesetzt.

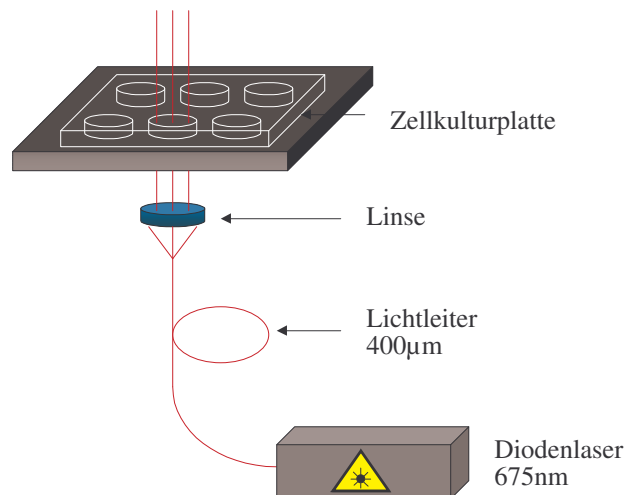


Abb.4 Versuchsaufbau der PDT von extrazellulärer Matrix in 6-Well-Platten: Am Ende des Lichtleiters befindet sich eine Streulinse, die eine homogene Bestrahlung des Wells ermöglicht. Die 6-Well-Platte befindet sich auf einer Lochplatte, die eine Abschirmung des Laserlichts gegenüber der restlichen Wells bewirkt.

2.6 Bestimmung der Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen nach Photodynamischer Therapie von extrazellulärer Matrix

Nach PDT von ECM wurden EC und SMC mit einer Dichte von 2×10^5 /Well auf 6-Well-Platten aufgetragen. Um eventuelle Effekte des Lasers bzw. des CASPc festzustellen, wurden parallel die gleichen Zelldichten der EC bzw. SMC auf unbehandelte ECM (KO), auf reine 6-Well-Platten ohne Anwesenheit von ECM (PL), auf ECM, die nur dem Laserlicht ausgesetzt war (LO) und auf ECM, die nur dem CASPc ausgesetzt war (DT) aufgetragen. Für LO wurde die isolierte ECM mit 1ml PBS bedeckt und mit 100 J/cm^2 bestrahlt. Für DT wurde die isolierte ECM unter Lichtausschluß lediglich mit 1ml des Photosensitizers CASPc ($5 \mu\text{g/ml}$) bedeckt und zwei Stunden inkubiert. Anschließende Waschvorgänge von LO und DT wurden identisch mit den der PDT-Gruppe durchgeführt. Nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 in 5%igem supplementiertem Medium wurden die Zellen mit 0,5ml/Well Trypsin/EDTA (0,05/0,02% in PBS ohne $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$) 10min abgelöst und mittels Durchflußzytometrie (siehe oben) gezählt.

2.7 mRNA-Extraktion nach Roche (mRNA Isolation Kit)

Die in 6-Wells gewachsenen Zellen wurden einmal mit 1ml sterilem PBS gewaschen, anschließend wurde 0,5ml Lysispuffer (0,1M Trispuffer, 0,3M LiCl, 10mM EDTA, 1% Lithium Dodecylsulfat, 5mM Di-thio-treitol (DTT), pH 7,5) zugegeben. Die Homogenisierung wurde mittels Qiashredder (Qiagen, Hilden) durch zentrifugieren bei 14000U/min für 2min durchgeführt. Um die Streptavidin-Magnetpartikel (10mg/ml in 50mM Hepes, 0,1% bovines Serumalbumin, 0,1% Chloracetamid, 0,01% Methylisothiazolon, pH 7,4) von ihrem Lagerungspuffer zu separieren, wurden die Partikel resuspendiert und je 50 μl in 1,5ml Eppendorfhütchen (Eppendorf, Hamburg) pipettiert und mittels Magnetseparator (Roche, Mannheim) gebunden. Der Puffer wurde abpipettiert und die Magnetpartikel wurden anschließend mit 70 μl Lysispuffer durch Resuspendieren gewaschen. Zu den lysierten Proben wurden je 0,5 μl Oligo(dt)₂₀-biotingebundene Lösung (100pmol/ μl) gegeben. Dieses Gemisch wurde zu den Magnetpartikeln gegeben, resuspendiert und 5min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die nun an die mRNA gebundenen Magnetpartikel mittels Magnetseparator von

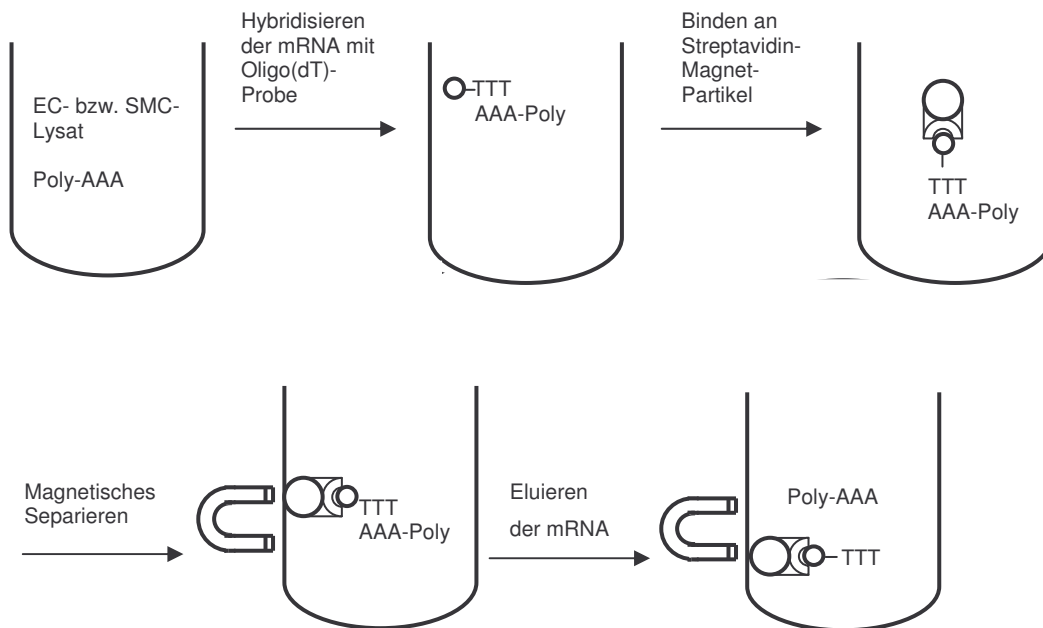


Abb.5 Schematische Darstellung der mRNA-Isolation: zunächst wird der Poly-A-Schwanz der mRNA (Poly-AAA) mit komplementären Basen (Oligo(dT)-Probe) gebunden. Die Oligo(dT)-Probe und damit die mRNA wird an Magnetpartikel gebunden und kann dadurch in einem weiteren Schritt mit einem Magnetseparator von den übrigen Lysatbestandteilen getrennt werden. Durch Hinzugeben von sterilem Wasser und Erhitzen wird die mRNA von der Oligo(dT)-Probe frei (eluiert) und ist somit extrahiert.

der Lösung getrennt und dann je dreimal 200ml Waschpuffer (10mM Trispuffer, 0,2M LiCl, 1mM EDTA, pH 7,5) zugegeben, resuspendiert und separiert (Waschen). Um die mRNA zu eluieren wurde nach dem letzten Waschschrift der Waschpuffer vollständig entfernt, 8µl Wasser (RNase-frei) zugegeben und 2min bei 65°C inkubiert. Die Magnetpartikel wurden erneut separiert, der Überstand (mRNA-Lösung) in neue RNase-freie Eppendorfhütchen transferiert und bei -80°C gelagert.

2.8 Erststrang cDNA-Synthese nach Pharmacia (First-Strand cDNA Synthesis Kit)

Zur Durchführung einer reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) muß die mRNA in eine stabilere komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben werden. Der optimale Bereich des mRNA-Einsatzes wurde durch eine Verdünnungsreihe der mRNA ermittelt. Hierzu wurde 0,5 bis 8µl der mRNA-Lösung

(in 0,5µl-Schritten) mit 0,1% Diethyl Pyrocarbonat (DEPC-Wasser) auf ein Gesamtvolumen von 8µl gebracht und zur cDNA-Synthese eingesetzt.

Die cDNA-Synthese wurde daraufhin für alle Proben einheitlich durchgeführt. Hierzu wurden 1µl der isolierten mRNA mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 8µl gebracht, bei 65°C für 10min inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. 5µl des Bulk First-Strand cDNA Reaktionsmixes (Murine reverse Transcriptase, RNAGuard, 132µg/ml RNase/DNase-freies BSA, 3mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 74,25mM TrisCl pH 8,3, 112,2mM KCl, 14,85mM MgCl₂) zusammen mit 1µl (200mM) und 1µl pd(N)₆ Primer (0,2µg/µl random Hexadeoxynucleotid) wurden in ein separates steriles 0,5ml Eppendorfhüttchen pipettiert und resuspendiert. Die mRNA wurde zugegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Um die evtl. noch aktiven Enzyme zu denaturieren, wurde die Probe 5min bei 95°C erhitzt. Die Probe wurde anschließend auf Eis gekühlt und bei -20°C gelagert [Di Blasio et al., 1993].

2.9 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (LightCycler™)

2.9.1 Grundlagen der Methode

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird ein bestimmter Genombezirk eines Organismus mittels spezifischen Oligonukleotiden (Primer) und DNA-Polymerase amplifiziert.

Das Prinzip des LightCycler™ stellt ein völlig neu entwickeltes Geräte- und Reagenziensystem dar. Es erlaubt nicht nur äußerst schnelle Zykluszeiten für die PCR, sondern auch die gleichzeitige online und realtime Detektion der Reaktionskinetik. Die ultraschnellen Zykluszeiten ermöglichen zum Beispiel 30 PCR Zyklen in weniger als 20 Minuten. Erreicht wird dies durch einen sehr effizienten Aufheiz- und Abkühlungsprozess, durch wechselnde Zufuhr von heißer und kühler Luft. Durch den Einsatz von Glaskapillaren als Reaktionsgefäße und deren günstigem Verhältnis von Oberfläche zu Volumen stellt sich die gewünschte Temperatur im Reaktionsansatz innerhalb von Millisekunden ein. Die Glaskapillaren dienen außerdem als optisches Element zur Detektion der Fluoreszenz und damit der amplifizierten DNA in der Probe. Die entstehende Fluoreszenz wird kanalisiert und konzentriert an der Spitze der Kapillare zur Messoptik abgeleitet.

Das Detektionssystem des LightCyclers™ ist eine hochpräzise Optik gekoppelt mit einer Spezialsoftware. Diese nimmt während jedes PCR Zyklus in der vom Anwender vorgegebenen PCR-Phase das Fluoreszenzsignal wahr (realtime) und visualisiert es im selben Moment auf den Bildschirm (online).

Es gibt verschiedene Wege die Korrelation der Menge des PCR-Produkts darzustellen. Die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelseparation und Anfärbung mit Ethidium Bromid ist wohl die verbreitetste. Ethidium Bromid wird aber wegen der geringen Sensitivität und Spezifität nicht im LightCycler™ System verwandt. Die Verwendung des Farbstoffs SYBR Green I, der an doppelsträngiger DNA bindet ist spezifischer, da diese Substanz praktisch nur Fluoreszenzsignale abgibt, wenn sie an doppelsträngige DNA gebunden ist.

Während der verschiedenen Stufen der PCR ergeben sich unterschiedliche Intensitäten des Fluoreszenzfarbstoffsignals, welches von der Menge an doppelsträngiger DNA abhängig ist. Die gesamte DNA liegt in der Denaturierungsphase als Einzelstrang vor. Somit liegt die Zielsequenz für die Erkennung der Primer frei. SYBR Green I kann sich zu diesem Zeitpunkt nicht an die DNA koppeln, weshalb die Intensität des Fluoreszenzsignals schwach ist (*Abb.6a*). Während der Anlagerung der DNA (Annealing) hybridisieren die Primer an der Zielsequenz. Die DNA liegt vereinzelt in doppelsträngiger DNA vor, an denen der Farbstoff binden kann (*Abb.6b*). In der Elongationsphase wird die DNA abgelesen und vervielfacht, wodurch mehr SYBR Green I gebunden wird (*Abb.6c*). Am Ende der Elongationsphase liegt die gesamte DNA doppelsträngig vor und das Maximum des Fluoreszenzsignals des Farbstoffs wird erreicht (*Abb.6d*). Die Fluoreszenz wird während der quantitativen PCR deshalb am Ende der Elongationsphase bei 530nm gemessen. Da diese proportional zum Gehalt des PCR-Produktes ist, kann eine Verstärkung des Signals von Zyklus zu Zyklus festgehalten werden.

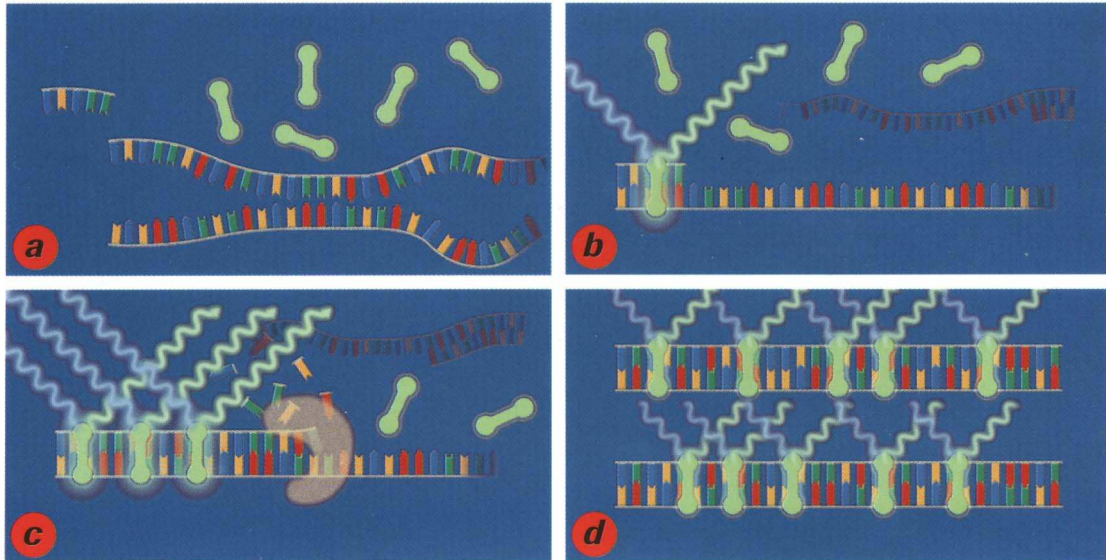


Abb.6 Schematische Darstellung der Bindung des SYBR Green I in den einzelnen PCR-Phasen. a: Denaturierung; b: Annealing; c: Elongation; d: Ende der Elongation. (aus Roche Molecular Biochemicals, Lightcycler System™, Betriebshandbuch)

Da eine PCR nur wenige Zyklen besitzt, in denen sich der Gehalt des Produkts logarithmisch vermehrt, bevor die PCR-Effizienz gegen null geht, wird eine akkurate Quantifizierung nur dann gewährleistet, wenn sie in diesen wenigen Zyklen der logarithmischen Phase durchgeführt wird. Einzelzyklusbetrachtung, wie sie im LightCycler™ durchgeführt wird, kann die Zyklen, in denen sich die PCR in ihrer sogenannten log-linearen Phase befindet, präzise identifizieren. Log-lineare Phase bedeutet, dass sich das PCR-Produkt mit jedem Zyklus verdoppelt. Nur während dieser Phase lassen sich genaue Rückschlüsse auf die Anfangskonzentration der Zielsequenz ziehen. Hierzu wird eine Verdünnungsreihe (Standard) mit bekannter Konzentration mit unbekannten Proben simultan amplifiziert. Nachdem die PCR beendet ist, berechnet die LightCycler Software die logarithmische Phase der einzelnen Proben und ermittelt eine interpolierte Gerade mit der sie die Schnittpunkte der Zykluszahl festlegt. Diese Zykluszahlen werden gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. Die Konzentrationen der Zielsequenz der Standards und die der unbekannten Proben werden ermittelt, indem die Schnittpunkte (Zykluszahlen) der Proben mit den Schnittpunkten des Standards verglichen werden.

Das LightCycler™ System ist dazu in der Lage über eine so genannte Schmelzkurven-Analyse Aussagen über die Sequenzen des amplifizierten Produktes zu machen. Die

Schmelzkurven-Analyse wird nach Beendigung der Amplifikationszyklen durchgeführt. Die Produkte werden zunächst bei 95°C denaturiert, bei 60°C hybridisiert und dann langsam in 0,2°C Intervallen auf 95°C erhitzt. Während dieses Prozesses wird die Fluoreszenz in jeder Kapillare bei jedem Temperaturintervall gemessen. Dies lässt genaue Rückschlüsse auf das Schmelzverhalten des PCR-Produkts zu. Sobald die DNA denaturiert ist, wird der SYBR Green I Farbstoff von der doppelsträngigen DNA freigesetzt, wodurch das Fluoreszenzsignal abnimmt. Die Schmelztemperatur (T_m) eines Fragmentes kann einfach visualisiert werden, indem die erste negative Ableitung dieser Schmelzkurve ($-dF/dT$) berechnet wird. In einem Graph dargestellt, resultiert der Wendepunkt der Schmelzkurve dann in einem Peak, dessen Maximum dem der T_m entspricht.

Jedes doppelsträngige DNA-Produkt hat eine spezifische T_m , definiert durch die Temperatur bei der 50% der DNA in einzelsträngiger Form vorliegt und 50% als Doppelstrang übrigbleibt. Die bestimmenden Faktoren, die die T_m der doppelsträngigen DNA ausmachen, sind Länge und Guanin- bzw. Cytosintriphosphat-Gehalt des Fragments. Die Überprüfung der T_m eines PCR-Produktes kann so mit der Längenanalyse im Gel verglichen werden. Die Anwesenheit einer spezifischen Zielsequenz kann durch Einsatz einer bekannten Positivkontrolle zusammen mit den unbekannten Proben während der PCR bewiesen werden. Die unbekannten Proben und die Positivkontrolle werden so unter identischen Bedingungen amplifiziert und anschließend durch die Schmelzkurven-Analyse und den Vergleich der jeweiligen T_m der Produkte der unbekannten Proben mit der T_m der Positivkontrolle identifiziert.

2.9.2 Quantitative PCR für bFGF

Um die optimalen Bedingungen für die PCR von β -Actin und bFGF herauszufinden, wurden zunächst die optimalen $MgCl_2$ -Konzentrationen ermittelt. Die β -Actin bzw. bFGF Ansätze enthielten 1mM, 2mM, 3mM, 4mM bzw. 5mM $MgCl_2$.

Bei der quantitativen PCR der einzelnen Versuche wurden dann immer die gleichen optimierten Bedingungen eingehalten. Hierzu wurde zunächst ein PCR Master-Ansatz angesetzt, der alle Reagenzien aller Reaktionen von entweder β -Actin oder bFGF bis auf die cDNA der zu bestimmenden Probe enthielt. Für je einen Reaktionsansatz (Endvolumen 20 μ l) zur Bestimmung von β -Actin wurden 1mM (0,8 μ l) $MgCl_2$, 2 μ l LightCycler™-DNA Master SYBR Green I (Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer,

dNTP-Mix mit dUTP anstatt dTTP, SYBR Green I Farbstoff, 1mM MgCl₂), 1µl (je 5pmol) β-Actin- Primer [Asselin et al., 1997] (Eurogentec, Seraing, Belgien) [je 0,5µl Back-Primer (5'-CAA-CTG-GGA-CGA-CAT-GGA-GAA-GAT-CTG-GCA-3') und For-Primer (5'-GAG-GAT-CTT-CAT-GAG-GTA-GTC-TGT-CAG-GTC-3')] und 14,2µl steriles Wasser in ein Eppendorfhütchen pipettiert. Für je einen Reaktionsansatz zur Bestimmung von bFGF wurden 1mM (0,8µl) MgCl₂, 2µl LightCycler-DNA Master SYBR Green I, 2µl (je 10pmol) bFGF-Primer [Di Blasio et al., 1993] (Eurogentec, Seraing, Belgien) je 1µl Back-Primer (5'-GGC-TTC-TTC-CTG-CGC-ATC-CA-3') und For-Primer (5'-GCT-CTT-AGC-AGA-CAT-TGG-AAG-A-3') (Position 215 bis 568, gezählt nach ABRAHAM [Abraham et al., 1986] und 13,2µl steriles Wasser in ein Eppendorfhütchen pipettiert. Anschließend wurden je 18µl des Master-Mixes in eine vorgekühlte Glaskapillare gegeben und je 2µl der entsprechenden cDNA zugegeben, mit einem Stopfen verschlossen und bei 1000U/min für 10 Sekunden zentrifugiert.

Pro aufgetragenen Versuchsdurchlauf wurden zwei Verdünnungsreihen mit den Konzentrationen 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ und 10⁻⁴ aus dem internen Standard (β-Actin) aufgetragen. Hierzu wurde β-Actin, welches zuvor durch Gelextraktion (s.u.) isoliert wurde, 1:100 verdünnt (entspricht der Konzentration 1) und mit sterilem Wasser auf die entsprechende Verdünnung gebracht.

Die Proben wurden im LightCycler™ 2 Minuten bei 95°C prädenaturiert und durch 50 Zyklen bei je 95°C 1 Sekunde (Denaturierung), 58°C 10 Sekunden (Annealing) und 72°C 20 Sekunden (Elongation) amplifiziert. Um die Spezifität der Endprodukte zu überprüfen, wurden zum einen Schmelzkurven (60°C bis 95°C) aller Proben durchgeführt und mit der Positivkontrolle verglichen, zum anderen wurden die Amplifikationsprodukte mittels Gelelektrophorese (s.u.) dargestellt.

Die Quantifizierung der Versuchsproben wurde, wie oben beschrieben, durch die Software des LightCyclers ausgewertet. Hierbei wurde die Auswertungsoption "Second Derivative Maximum" gewählt, da dadurch alle vom Anwender beeinflussbaren Einstellungen zur Auswertung von der Software übernommen werden und somit keine eventuell subjektive, sondern objektive Ergebnisse erzeugt wurden. Um präparative Unterschiede der mRNA auszugleichen, wurde β-Actin als interner Standard eingesetzt und ließ so Rückschlüsse auf den Anfangsgehalt der Gesamt-mRNA zu. Um die unterschiedlichen Gesamt-mRNA-Konzentrationen rechnerisch auszugleichen, wurden die bFGF-Werte durch die zugehörigen Werte des internen Standards dividiert. Somit konnten die bFGF-Werte direkt miteinander verglichen und in Bezug gesetzt werden.

2.9.3 Design der mRNA Expressionsuntersuchung

Es wurden drei Versuche (n=3) im Triplikat durchgeführt. Jeder Versuch beinhaltete drei Gruppen: PDT (Zellen die auf photodynamisch behandelte ECM gegeben wurden), KO (Zellen die auf unbehandelte ECM gegeben wurden), PL (Zellen die auf 6-Well-Platten ohne ECM gegeben wurden). Bei signifikanten Unterschieden nach PDT im Vergleich zu KO wurden zusätzlich die Gruppen LO (Zellen die auf ECM gegeben wurden, welche nur mit Licht bestrahlt wurden) und DT (Zellen die auf ECM gegeben wurden, welche nur dem PS CASPc ausgesetzt war) bestimmt. Um eine Referenz zu KO zu erhalten, wurde hierbei KO erneut aufgetragen. Hierdurch können die Werte für KO eines Zeitpunktes variieren. Die mRNA Expression von bFGF wurde nach 12, 24 und 48 Stunden nach Aufgabe der Zellen auf die unterschiedlich behandelten Zellkulturplatten und in Relation zu β -Actin bestimmt. Insgesamt wurden vier Kälberaorten für die vorliegenden Versuche zur Gewinnung der Zellen verwendet.

2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Bei dieser Methode werden Nukleinsäuren durch elektrischen Strom (Gleichstrom) ihrer Größe nach in einem Agarose-Gel getrennt. Mit Hilfe eines mitlaufenden Längenmarkers kann man auf die Größe der Nukleinsäure schließen.

1,2% Agarose wurde in 100ml 0,5x Tris-Borsäure-EDTA (TBE) Puffer (5x TBE Stammlösung: 54g/l Trisbase, 27,5g/l Borsäure, 20ml EDTA 5mM, pH 8,0) aufgenommen und unter Rühren bis zur völligen Auflösung erhitzt. Die Suspension wurde auf 40-50°C abgekühlt und es wurde 2 μ l Ethidiumbromid (10mg/ml) zugegeben. Das auf etwa 40°C abgekühlte Gel wurde in den dafür vorgesehenen Gelträger gegossen und der Gelkamm wurde eingesteckt. Nach der Polymerisation des Gels wurde dieses in die mit 0,5x TBE gefüllte Gelkammer (Biometra, Göttingen) gelegt und der Kamm, sowie die Gelträgerendstücke wurden entfernt. Die zu untersuchenden Nukleinsäureproben wurden mit 1/5 Ladepuffer (6x Ladepuffer: 30% Glycerol, 0,1% Orange G) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophoresekammer wurde geschlossen und eine Spannung von nicht mehr als 5V/cm Elektrodenabstand angelegt. Die Nukleinsäurebanden wurden anschließend unter einem UV-Transilluminator (Eagle Eye Transilluminator; Stratagene, Amsterdam, Niederlande) sichtbar gemacht und fotografiert.

2.11 DNA-Gelextraktion nach Qiagen

Die zu extrahierende und durch UV-Licht sichtbar gemachte DNA-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und gewogen. Das Gelstück wurde in ein Eppendorfhütchen gegeben, die dreifache Volumenmenge an QX1-Puffer zugegeben und 10min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde ein Gelvolumen an Isopropanol (100%) hinzupipettiert und gemischt. Die Probe wurde dann auf eine Qiaquick Säule pipettiert und bei 10000 x g für 1min zentrifugiert. Der Unterstand wurde abgeschüttet, 500µl QX1-Puffer (Qiagen-Kit, Hilden) auf die Säule gegeben und bei 10000 x g für 1min zentrifugiert. Um die Probe zu waschen wurde 750µl PE-Puffer zur Probe pipettiert und bei 10000 x g für 1min zentrifugiert. Der Unterstand wurde abgeschüttet und der verbliebene Waschpuffer durch nochmaliges zentrifugieren von der Säule getrennt. Die Säule wurde in ein neues Eppendorfhütchen transferiert, 30µl Elutionspuffer auf die Qiaquickmembran gegeben, 1min stehengelassen und dann für 1min bei 10000 x g zentrifugiert.

2.12 Big-Dye Terminator Sequenzierkit und ABI-PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer)

Die Didesoxynukleotide, die für die PCR mit der zu sequenzierenden DNA eingesetzt werden, sind bei diesem Verfahren mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert (jede der vier Basen mit einer unterschiedliche Farbe). Die Abfolge der entstehenden PCR-Fragmente kann durch einen Laser, der in der Lage ist die Farben zu detektieren, in einer anschließenden Gelelektrophorese analysiert werden. Die Gelelektrophorese am ABI-PRISM 377 DNA-Sequencer, sowie eine erste Korrekturlesung der DNA-Sequenz wurden von einer technischen Assistentin durchgeführt.

4µl des Terminator Ready Reaction Mix (A-Farbstoff markiert mit dichloro(R6G) Terminator, C-Farbstoff markiert mit dichloro(ROX), G-Farbstoff markiert mit dichloro(R110), T-Farbstoff markiert mit dichloro(TAMRA), Deoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dITP, dUTP), AmpliTaq DNA Polymerase, MgCl₂, Tris-HCl Puffer, pH 9,0), 5µl der geextrahierten bFGF-DNA und 1µl (10µM) des For- bzw. des Back-Primers wurden in ein Eppendorfhütchen pipettiert und mit Mineralöl beschichtet. Der Ansatz wurde dann in einem Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) bei 96°C 10s

(Denaturierung), 50°C 5s (Annealing), 60°C 4min und 30 Zyklen inkubiert. Die DNA wurde anschließend mit 2µl Natriumacetat (3M Na-Acetat pH 5,2, 12,5mg/ml Dextranblau; alle Sigma, Deisenhofen) und 50µl 100% Ethanol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) gefällt. Die Probe wurde eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und das entstandene Präzipitat anschließend für 30min bei 10000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet mit 250µl 70% Ethanol resuspendiert und dann für 10min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet für 1min bei 95°C getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 4µl Formamid-Lösung (Sigma, Deisenhofen) aufgenommen und im ABI-PRISM 377 DNA-Sequencer in einem Polyacrylamidgel durch Elektrophorese aufgetrennt und analysiert.

2.13 Statistik

Alle Messwerte sind jeweils als Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SD) angegeben. Bei paarweise Vergleichen kam ein zweiseitiger Student-t-Test für unverbundene Stichproben zur Anwendung. Bei Vergleichen mehrerer Experimentalgruppen (KO, PDT, LO, DT, PL) wurde ein univariater ANOVA mit Tukey's HSD für ungleiche n-Zahlen (Sjotvoll/Stoline) post hoc-Test angewendet, um festzustellen zwischen welchen der Versuchsgruppen statistisch unterschiedliche Ergebnisse auftraten.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen Software (Statistica, Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA). Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit für den α -Fehler von $\leq 0,05$ wurde die Null-Hypothese verworfen, die geprüften Daten als statistisch signifikant unterschiedlich angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Zelllinien

3.1.1 Charakterisierung der Endothelzellen

Die EC zeigten in der Phasenkontrastmikroskopie eine typische epitheliale Wuchsform mit polyglonalen Zellen und pflastersteinartiger Anordnung (*Abb.7*).



Abb.7 Phasenkontrastmikroskopie, Endothelzellen (*Originalvergrößerung x25*)

Um zu prüfen, ob die EC nicht mit SMC oder Fibroblasten kontaminiert waren und sich in Reinkultur befanden, wurden die EC in der ersten Passage mit dem DiI-Ac-LDL identifiziert (*Abb.8,9*). Als Kontrolle wurden die EC zusätzlich mit monoklonalem α -Actin Antikörper auf eventuelle SMC Verunreinigungen überprüft. Die in den Versuchen benutzten EC stellten sich ausschließlich in ihrem typischen Wachstumsmuster unter dem Mikroskop dar und zeigten das in *Abb. 8 und 9* gezeigte für EC charakteristische immuncytochemische Markierungsmuster.

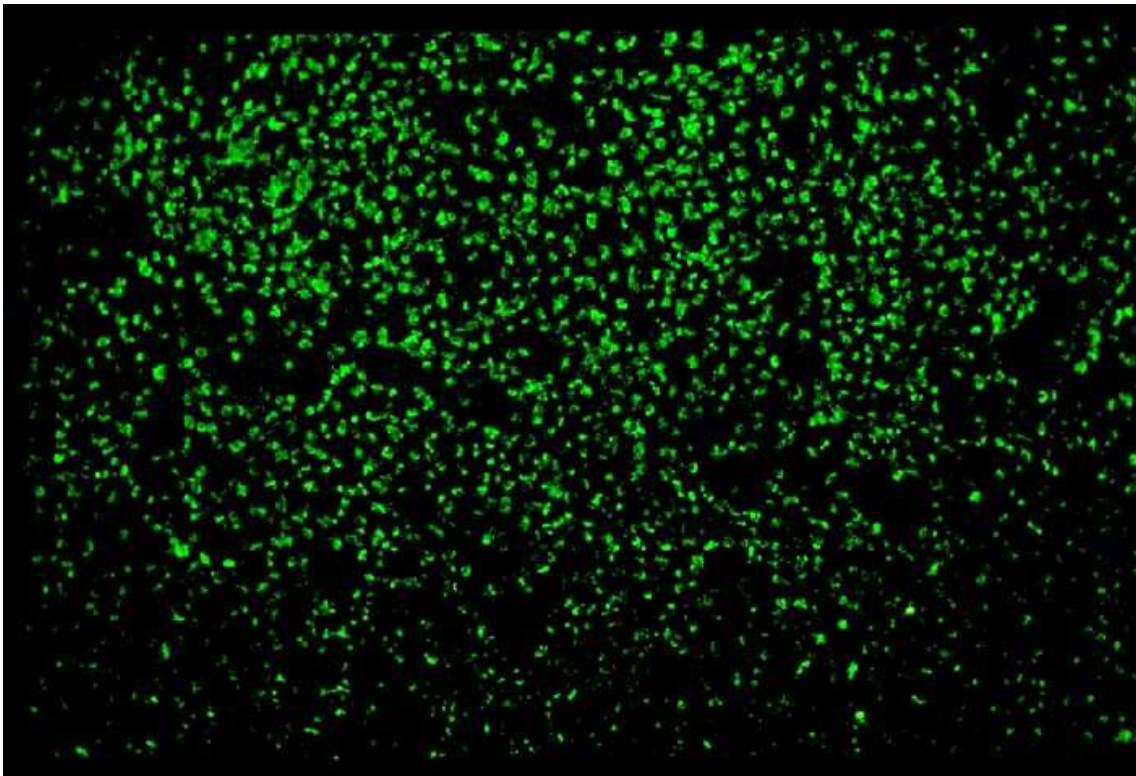


Abb.8 Fluoreszenzmikroskopie, Immuncytochemische Färbung mit Dil-Ac-LDL, Originalvergrößerung x25. Grüngefärbte Bereiche stellen die mit Dil markierten intrazellulären Membranen dar.

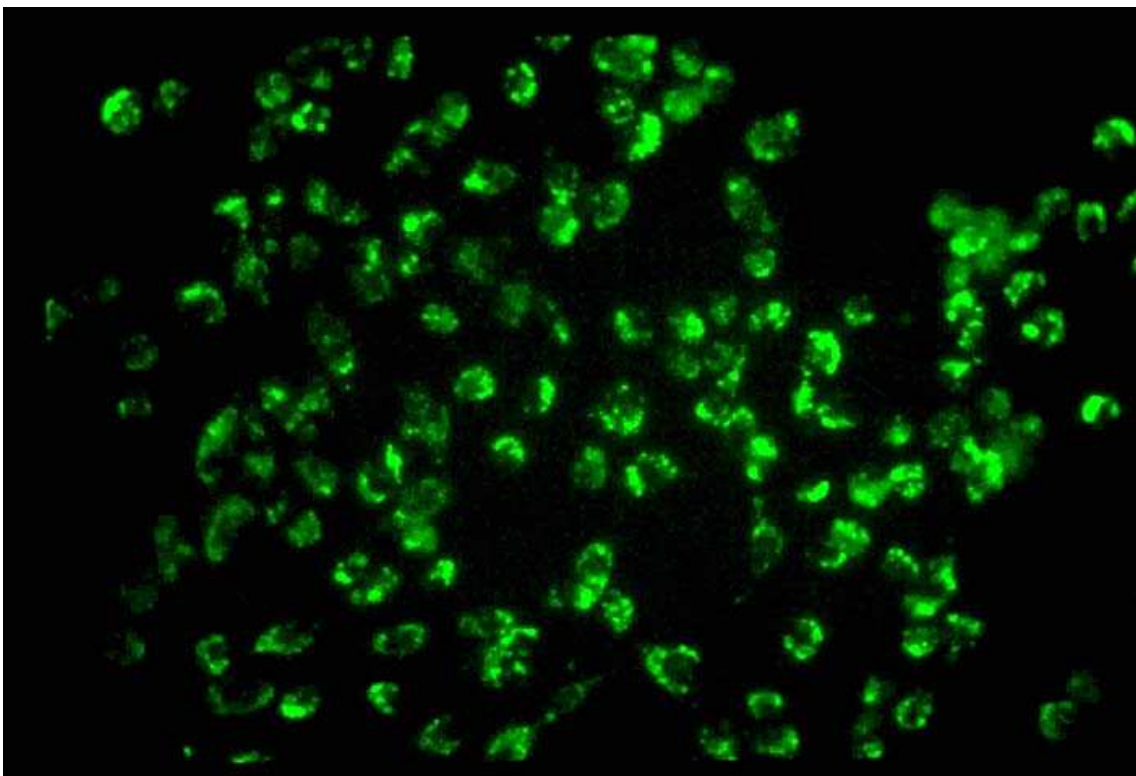


Abb.9 Fluoreszenzmikroskopie, Immuncytochemische Färbung mit Dil-Ac-LDL, Originalvergrößerung x50. Grüngefärbte Bereiche stellen die mit Dil markierten intrazellulären Membranen dar.

3.1.2 Charakterisierung der glatten Muskelzellen

Die SMC zeigten in der Phasenkontrastmikroskopie eine typische langgestreckte Wuchsform mit wirbelartiger Anordnung und fischzugartigem Wachstumsmuster (*Abb.10*).

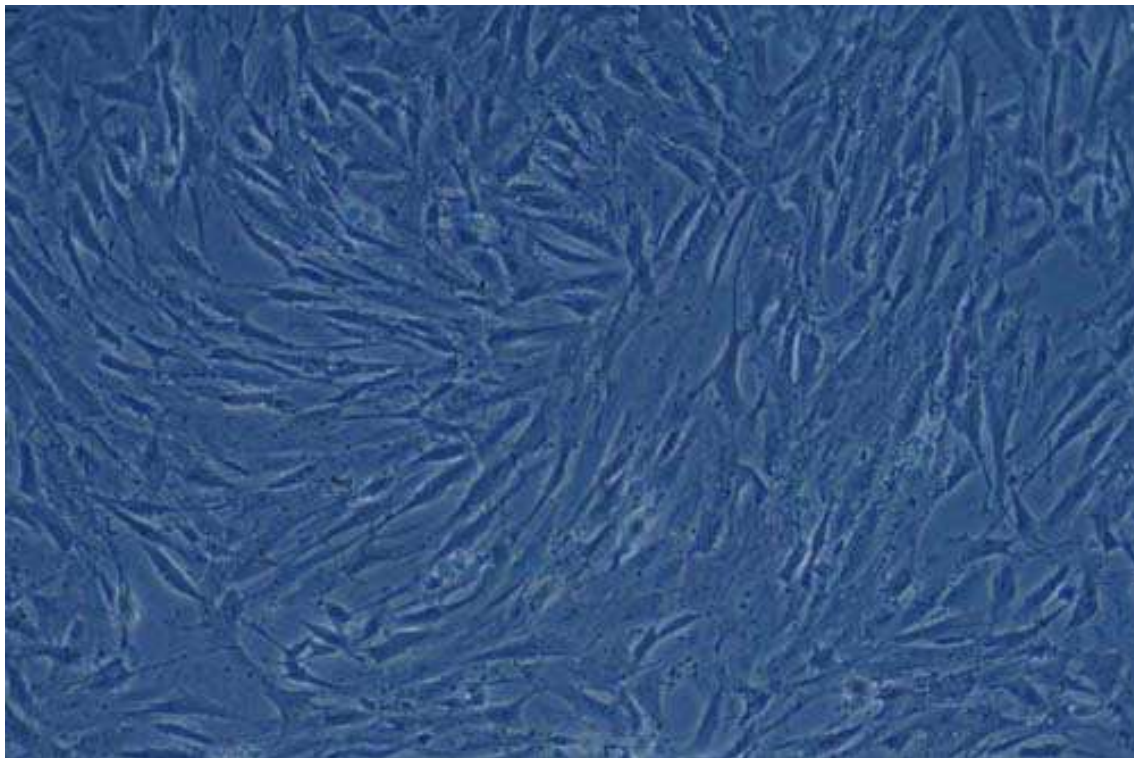


Abb.10 Phasenkontrastmikroskopie, Glatte Muskelzellen (*Originalvergrößerung x25*)

Um sicherzustellen, daß die SMC-Versuche mit Reinkulturen durchgeführt wurden, wurden die SMC in ihrer ersten Passage mit monoklonalem α -Actin Antikörper charakterisiert (*Abb.11,12*). Zusätzlich wurden die Zellen mit einem DiI-Ac-LDL, welches spezifisch vaskuläre Endothelzellen und Makrophagen identifiziert inkubiert, um mögliche Kontaminationen mit diesen Zellen auszuschließen. Die in den Versuchen benutzten SMC stellten sich ausschließlich in ihrem typischen Wachstumsmuster unter dem Mikroskop dar und zeigten das in *Abb. 11* und *12* dargestellte für SMC charakteristische Markierungsmuster der Immuncytochemie.

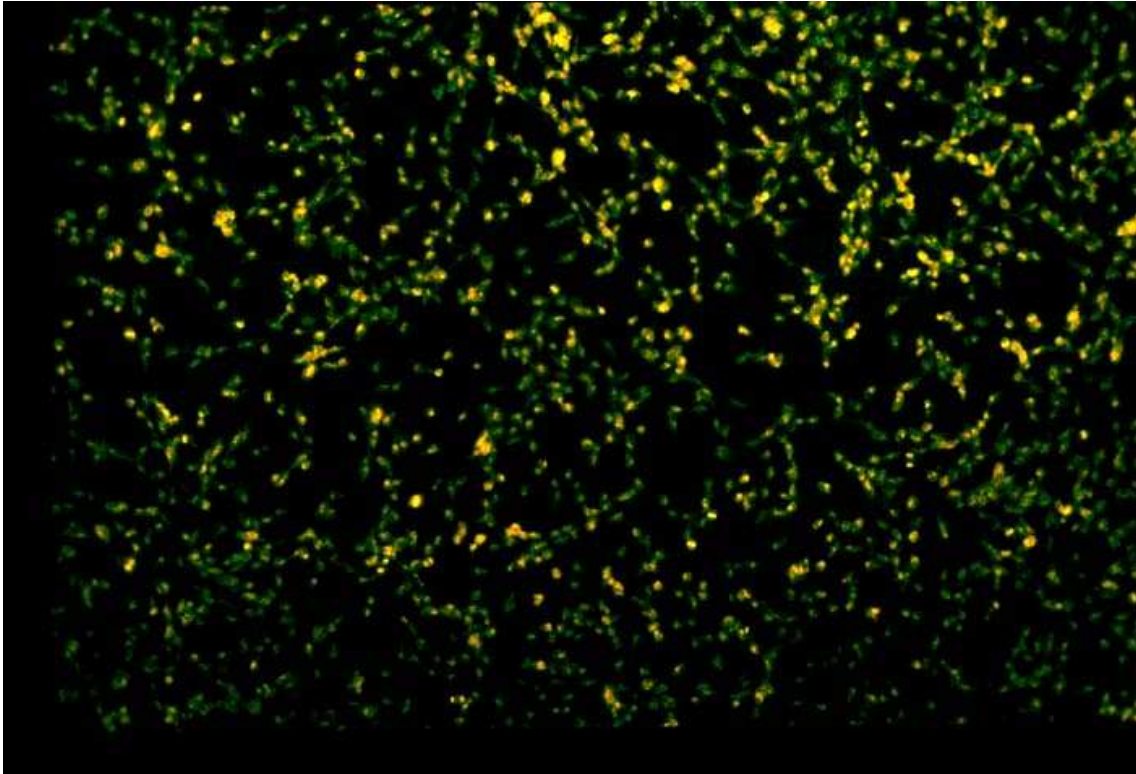


Abb.11 Fluoreszenzmikroskopie, Immuncytochemische Färbung mit monoklonalem α -Actin Antikörper, Originalvergrößerung x25. Grüngefärbte Bereiche stellen die α -Actin Isoform der glatten Muskelzellen dar. Orangegefärbte Bereiche zeigen die Kernfärbung mit Ethidiumbromid.

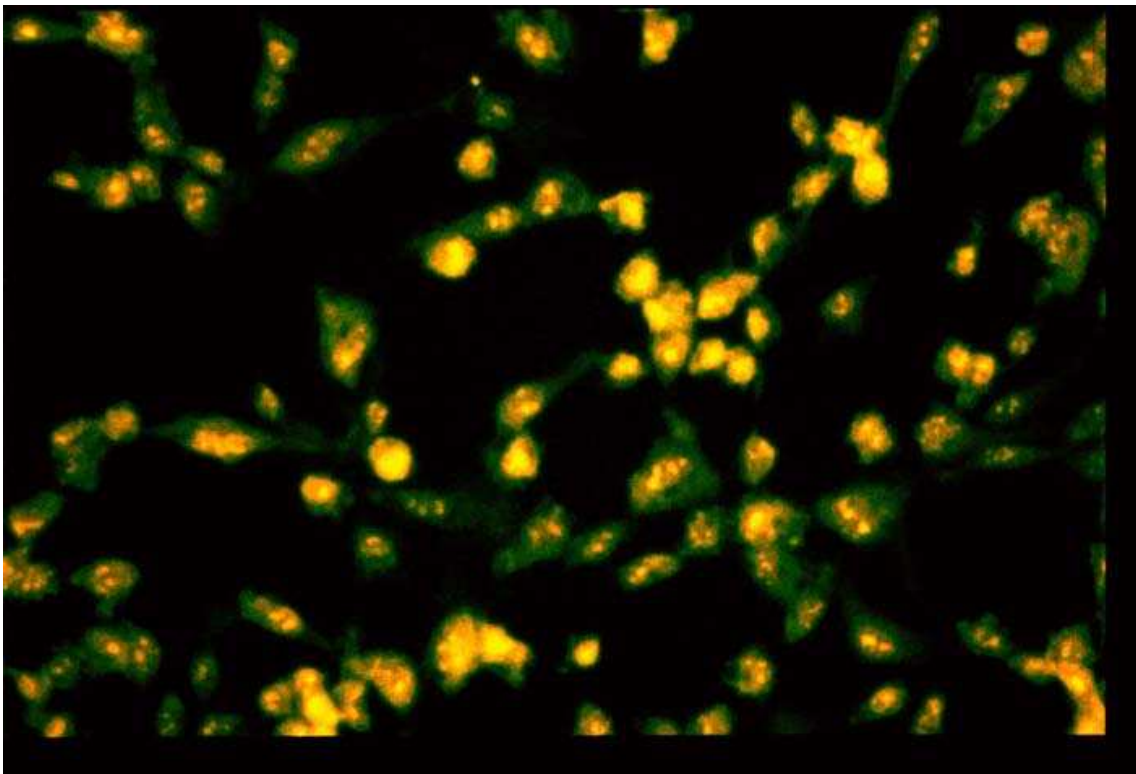


Abb.12 Fluoreszenzmikroskopie, Immuncytochemische Färbung mit monoklonalem α -Actin Antikörper, Originalvergrößerung x50. Grüngefärbte Bereiche stellen die α -Actin Isoform der glatten Muskelzellen dar. Orangegefärbte Bereiche zeigen die Kernfärbung mit Ethidiumbromid.

3.2 Bestimmung der Proliferation

3.2.1 Bestimmung der Proliferation von Endothelzellen

Um zu zeigen, welchen Effekt die Anwesenheit von unbehandelter ECM (KO), PDT behandelter ECM (PDT), nur mit Laser bestrahlter ECM (LO), ECM, die nur dem CASPc ausgesetzt war (DT) und von unbeschichteter Zellkulturplatte (PL) auf EC bzw. SMC in diesem Modell haben, wurden EC bzw. SMC auf die entsprechend vorbehandelten 6-Well-Platten aufgetragen und 24, 48 bzw. 72 Stunden später die Proliferation bestimmt.

Nach 24 Stunden zeigten die auf PDT behandelten ECM aufgegebenen EC eine signifikante Proliferationszunahme von 11% in Relation zu EC auf unbehandelter ECM (KO). Auch die EC, die auf 6-Wells ohne ECM gegeben wurden zeigten eine signifikante Proliferationszunahme von 11% in Bezug zu KO. Die EC, die nur mit dem Laser bestrahlt wurden bzw. nur mit dem Photosensitizer behandelt wurden zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrem Wachstumsverhalten in Relation zu KO (Abb.13,16; Tab.3).

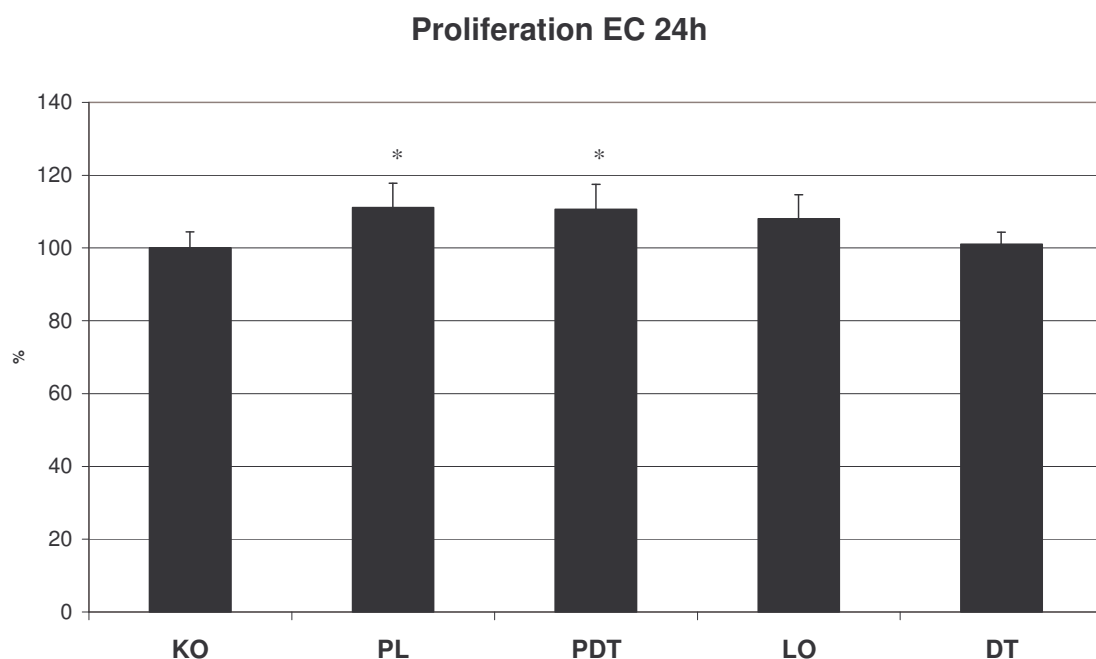


Abb.13 Proliferation von EC nach 24h Wachstum auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT), nur mit Laser bestrahlte ECM (LO), nur mit CASPc behandelte ECM (DT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt. * Signifikanter Unterschied im Vergleich zu KO ($p < 0,05$).

Sowohl die EC, die auf PDT behandelter ECM für 48 Stunden verblieben, als auch die EC, die auf 6-Well-Platte ohne ECM gegeben wurden, zeigten eine signifikante Proliferationszunahme von 37 bzw. 31% verglichen mit KO. Die Gruppen LO und DT zeigten auch hier keine signifikante Änderung (Abb.14,16; Tab.3).

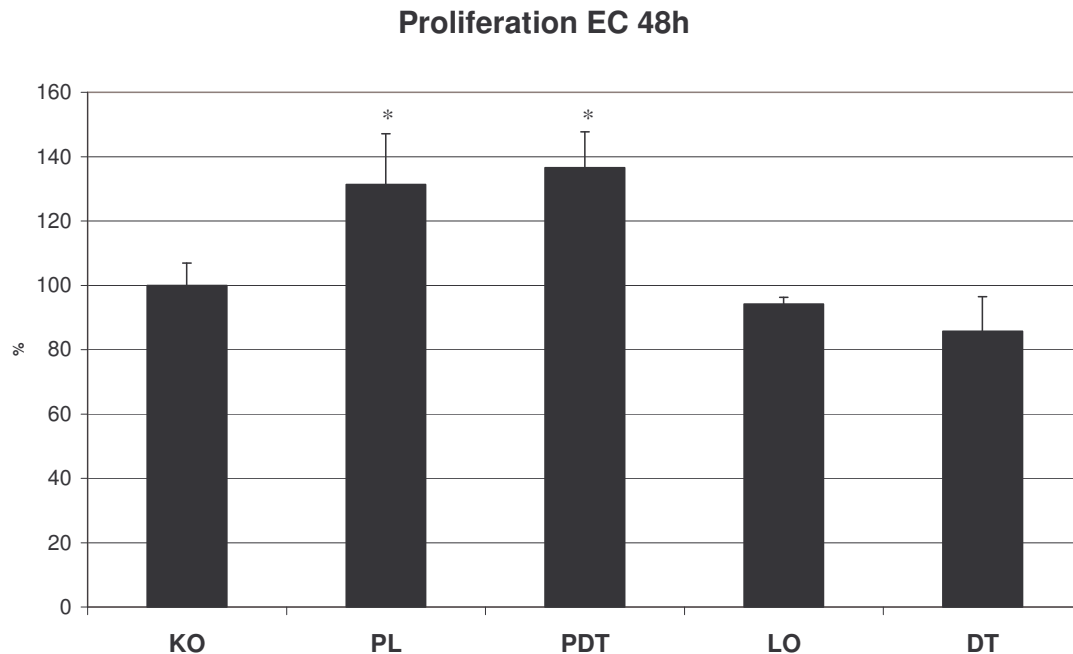


Abb.14 Proliferation von EC nach 48h Wachstum auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT), nur mit Laser bestrahlte ECM (LO), nur mit CASPc behandelte ECM (DT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt. * Signifikanter Unterschied im Vergleich zu KO ($p < 0,05$).

Verglichen mit KO zeigten die EC der PDT behandelten ECM und PL auch nach 72 Stunden Inkubation eine signifikante Proliferationszunahme von 39 bzw. 29%. Die Gruppen LO und DT demonstrierten keine signifikante Änderung gegenüber der EC, die auf unbehandelter ECM wuchsen (Abb.15,16; Tab.3).

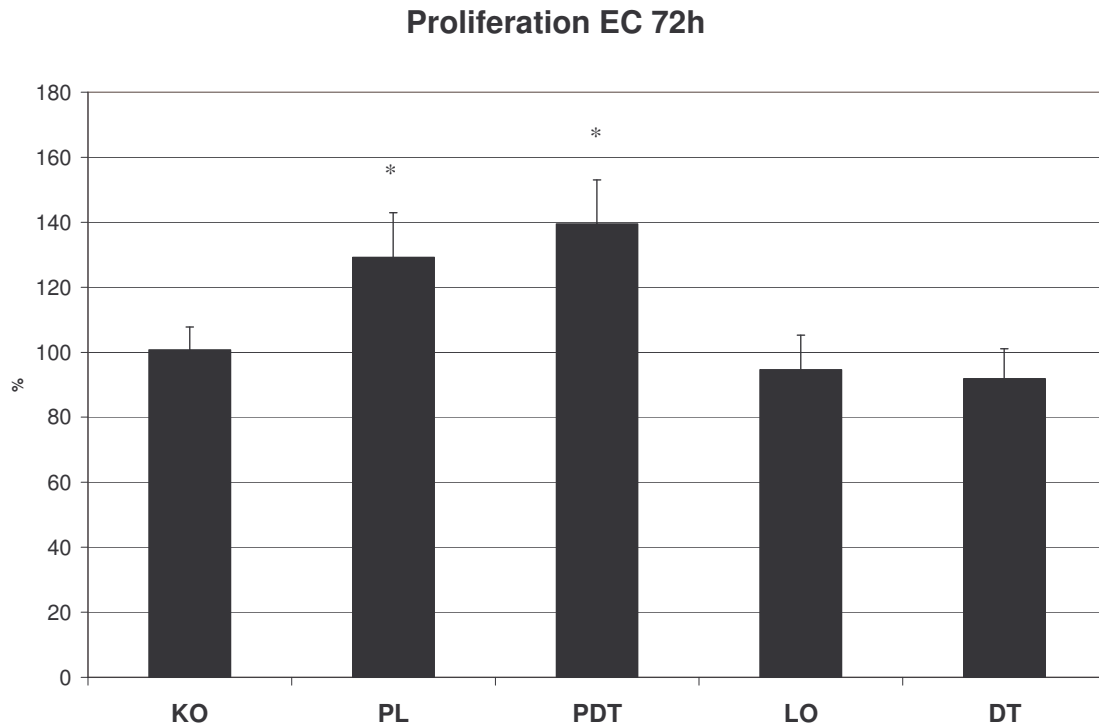


Abb.15 Proliferation von EC nach 72h Wachstum auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT), nur mit Laser bestrahlte ECM (LO), nur mit CASPc behandelte ECM (DT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt. * Signifikanter Unterschied im Vergleich zu KO ($p < 0,05$).

Zeitpunkt	Gruppe	Anzahl n	Mittelwert %	SD	p vs. KO
24 Stunden	PDT	12	111	7,6	<0,0003
	KO	12	100	4,4	
	PL	9	111	7,4	<0,0004
	LO	3	108	7,1	n.s.
	DT	3	101	3,3	n.s.
48 Stunden	PDT	12	137	15,2	<0,0001
	KO	8	100	6,9	
	PL	12	131	20,7	<0,0001
	LO	3	94	2,1	n.s.
	DT	3	86	9,2	n.s.
72 Stunden	PDT	19	139	18,9	<0,0001
	KO	21	101	7,1	
	PL	21	129	17,8	<0,0001
	LO	12	95	10,1	n.s.
	DT	7	92	8,5	n.s.

Tab.3 Proliferation von EC auf verschiedenen behandelten 6-Well-Platten. p-Werte sind in Bezug zu KO und sind bei Werten $< 0,05$ signifikant; nicht signifikant (n.s.). (n) gibt die Anzahl der Versuche wieder. EC auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT), nur mit Laser bestrahlte ECM (LO), nur mit CASPc behandelte ECM (DT).

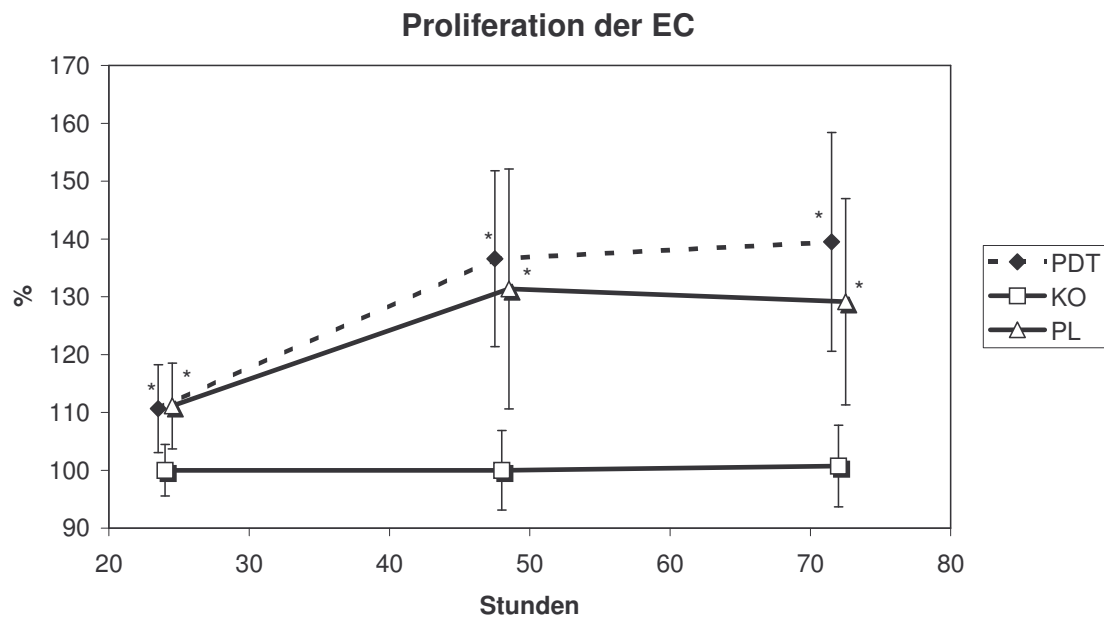


Abb.16 Proliferation von EC auf verschieden behandelten 6-Well-Platten nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit. EC auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt. Werte von PDT und PL sind jeweils signifikant (*) gegenüber KO.

3.2.2 Bestimmung der Proliferation von glatten Muskelzellen

Im Gegensatz zu den EC, wurden die SMC 24 Stunden nach PDT-Behandlung der ECM in ihrer Proliferation geringgradig um 9% in Relation zu SMC auf unbehandelter ECM signifikant gehemmt. Auch die SMC, die auf Zellkulturplastik inkubiert wurden, zeigten eine signifikante Proliferationsabnahme um 17% verglichen mit den SMC auf unbehandelter ECM (Abb.17,20; Tab.4).

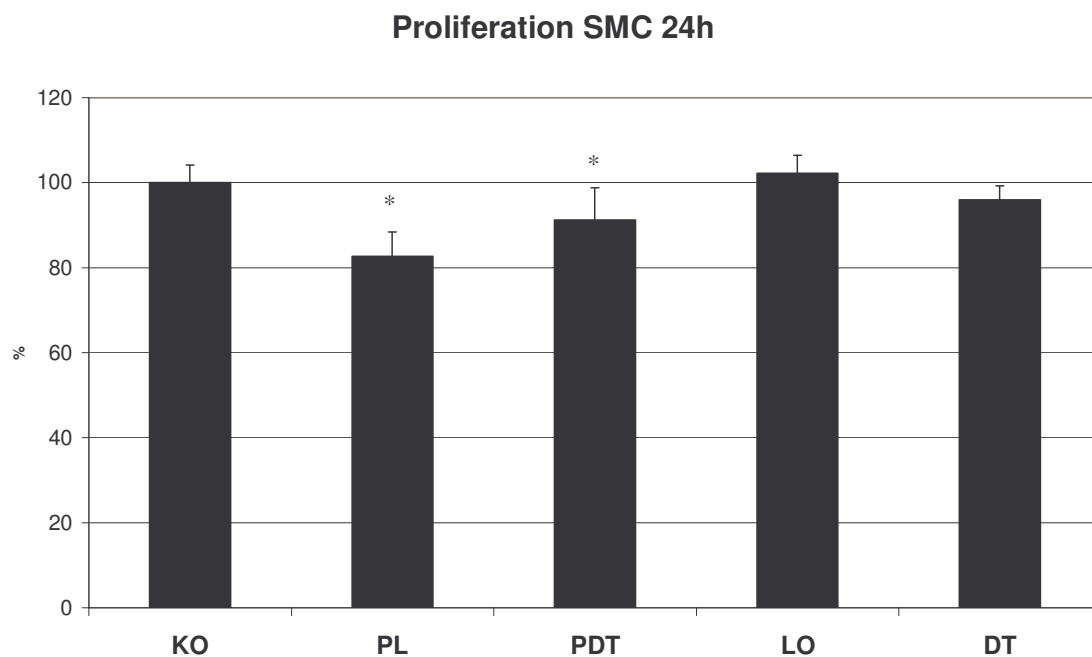


Abb.17 Proliferation von SMC nach 24h Wachstum auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT), nur mit Laser bestrahlte ECM (LO), nur mit CASPc behandelte ECM (DT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt. * Signifikanter Unterschied im Vergleich zu KO ($p < 0,05$).

Die Proliferationshemmung der SMC auf PDT behandelter ECM, sowie der SMC, die auf 6-Wells ohne ECM gegeben wurden hielt auch nach 48 Stunden an, PDT gegenüber KO signifikant um 9% und PL gegenüber KO signifikant um 33%. Die Gruppen LO und DT zeigten wiederum keine signifikante Unterschiede (Abb.18,20; Tab.4).

SMC von PDT behandelter ECM nach 72 Stunden wurden um 13% gegenüber der SMC auf unbehandelter ECM gehemmt. Die Proliferation der SMC auf 6-Wells ohne ECM ging um 24% signifikant gegenüber KO zurück (Abb.19,20; Tab.4).

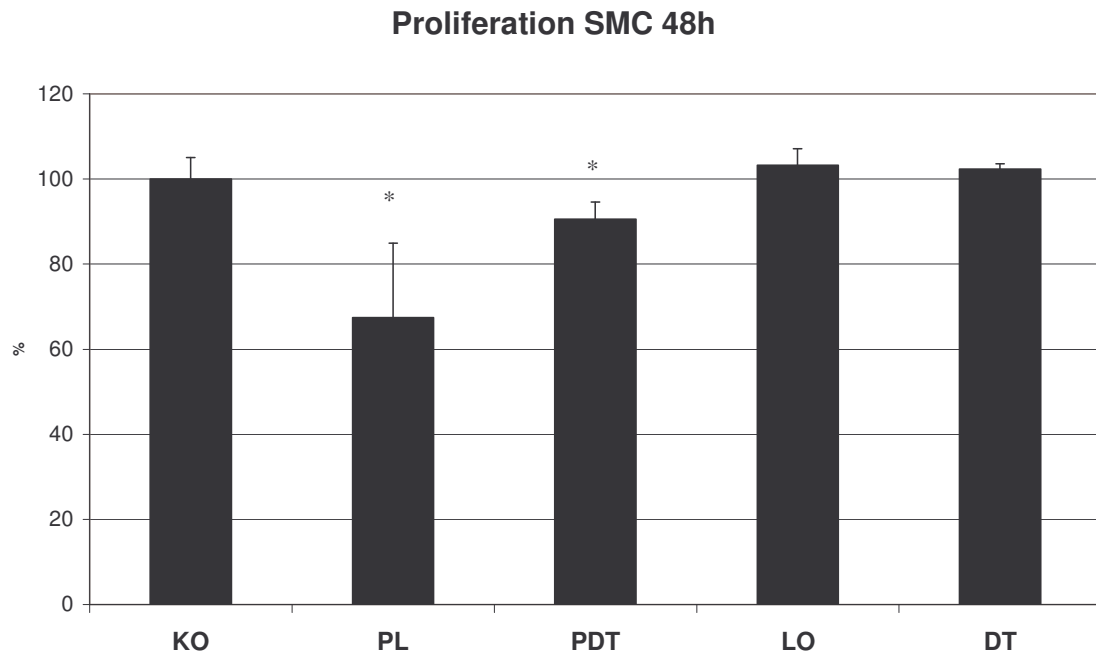


Abb.18 Proliferation von SMC nach 48h Wachstum auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT), nur mit Laser bestrahlte ECM (LO), nur mit CASPc behandelte ECM (DT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt. * Signifikanter Unterschied im Vergleich zu KO ($p < 0,05$).

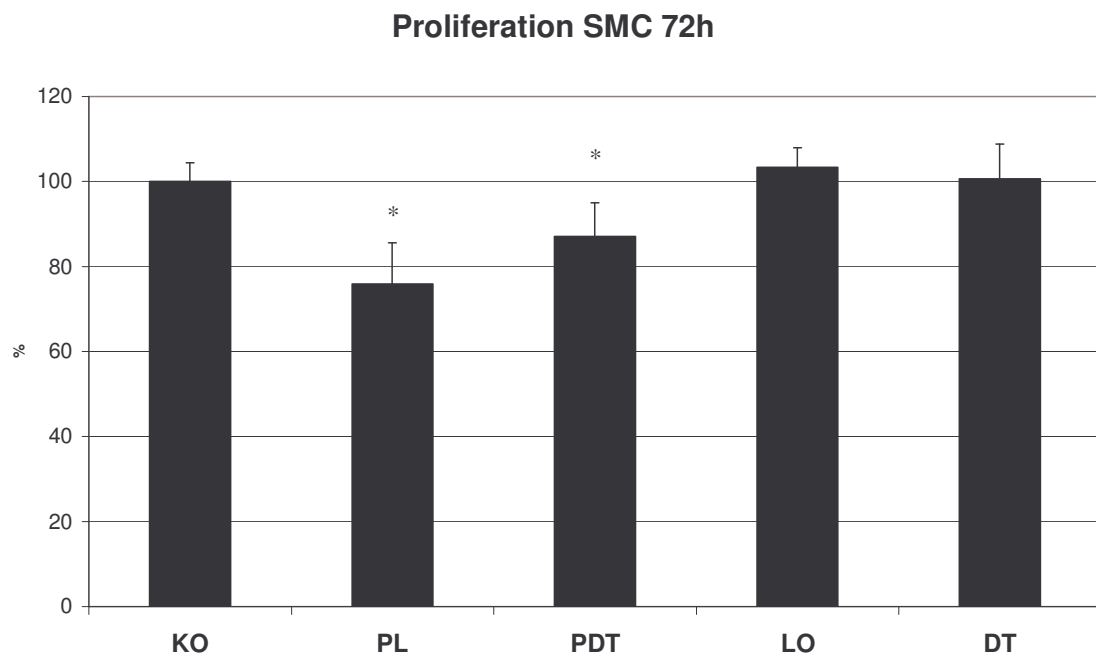


Abb.19 Proliferation von SMC nach 72h Wachstum auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT), nur mit Laser bestrahlte ECM (LO), nur mit CASPc behandelte ECM (DT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt. * Signifikanter Unterschied im Vergleich zu KO ($p < 0,05$).

Zeitpunkt	Gruppe	Anzahl n	Mittelwert %	SD	p vs. KO
24 Stunden	PDT	10	91	6,9	<0,002
	KO	12	100	4,2	
	PL	12	83	4,7	<0,0001
	LO	3	102	4,4	n.s.
	DT	3	96	3,1	n.s.
48 Stunden	PDT	10	91	3,7	<0,0001
	KO	11	100	5,1	
	PL	10	67	11,8	<0,0001
	LO	3	103	4,0	n.s.
	DT	3	102	1,3	n.s.
72 Stunden	PDT	13	87	6,9	<0,0001
	KO	17	100	4,4	
	PL	15	76	7,3	<0,0001
	LO	8	103	4,8	n.s.
	DT	6	101	8,2	n.s.

Tab.4 Proliferation von SMC auf verschieden behandelten 6-Well-Platten. *p*-Werte sind in Bezug zu KO und sind bei Werten < 0,05 signifikant; nicht signifikant (n.s.). (n) gibt die Anzahl der Versuche wieder. SMC auf unbehauelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behauelter ECM (PDT), nur mit Laser bestrahlte ECM (LO), nur mit CASPc behauelte ECM (DT).

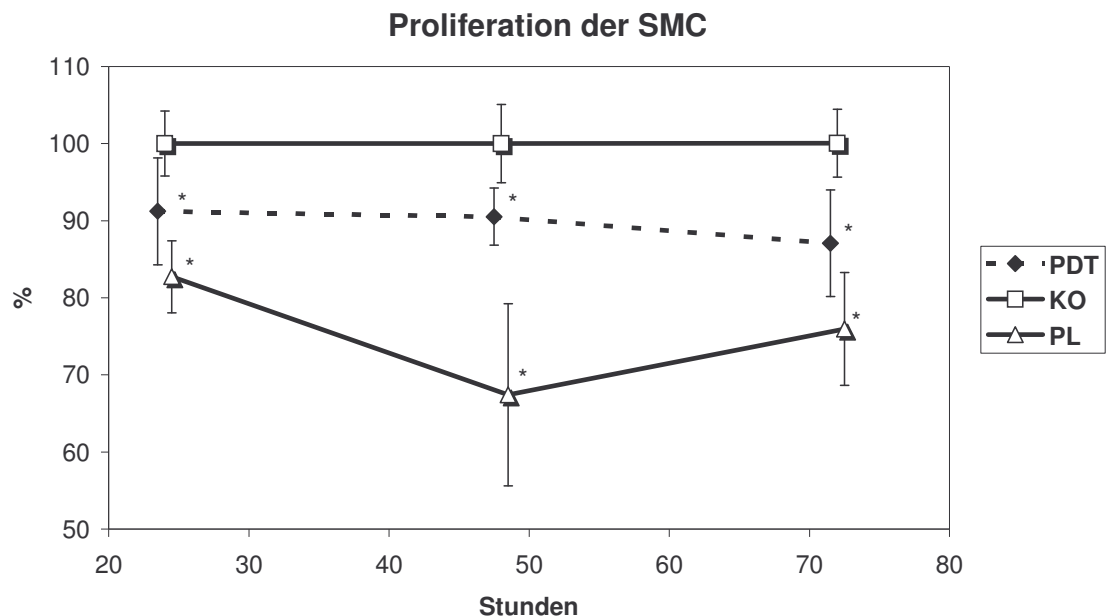


Abb.20 Proliferation von SMC auf verschieden behandelten 6-Well-Platten nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit. EC auf unbehauelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behauelter ECM (PDT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt. Werte von PDT und PL sind jeweils signifikant (*) gegenüber KO.

3.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (LightCycler™)

3.3.1 Optimierung der Quantitativen Polymerasekettenreaktion

Der optimale mRNA-Einsatz zur cDNA-Herstellung wurde durch eine Verdünnungsreihe der mRNA ermittelt. Es stellte sich heraus, daß der optimale Bereich für die cDNA-Synthese bei 1µl mRNA liegt (Abb.21).

Marker --- 0,5µl 1µl 1,5µl 2µl 2,5µl

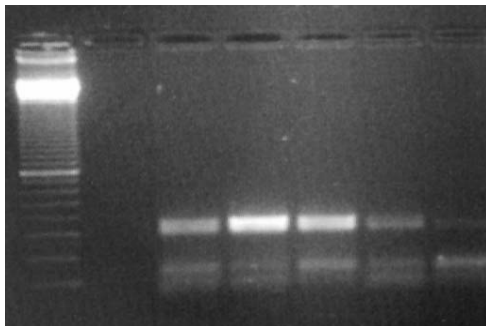


Abb.21 bFGF-RT-PCR mit unterschiedlichen mRNA-Konzentrationen bei der cDNA-Herstellung. (Marker) 100bp Marker. --- = Tasche ohne Einsatz. Die Zahlen geben den mRNA-Einsatz in µl wieder. Die bFGF-Banden befinden sich auf der Höhe von 354bp.

Um die optimalen Bedingungen für die PCR von β -Actin und bFGF herauszufinden, wurden die optimalen $MgCl_2$ -Konzentrationen ermittelt. Das spezifischste und stärkste Amplifikationsprodukt für β -Actin und bFGF ergab sich bei dem Einsatz von 2mM $MgCl_2$ (Abb.22).

Die Spezifität der Amplifikationsprodukte wurde zum einen durch die Schmelzkurven, zum anderen durch die Gelelektrophorese und anschließend durch die Sequenzierung der spezifischen Banden nachgewiesen.

Die Schmelzkurve der β -Actin-PCR zeigte ein spezifisches Zerfallsprodukt bei etwa 90,5°C. Bei der Durchführung der Schmelzkurve der bFGF-PCR ergab sich ein spezifisches Produkt bei etwa 87°C. Um eine Referenz zu erhalten, wurde die Reamplifikation von β -Actin bzw. bFGF durchgeführt, wovon vorher eine Sequenzierung durchgeführt wurde. Die jeweiligen Schmelzkurven zeigten das identische Zerfallsmuster, wie das der Amplifikationsprodukte von β -Actin und bFGF (Abb.23).

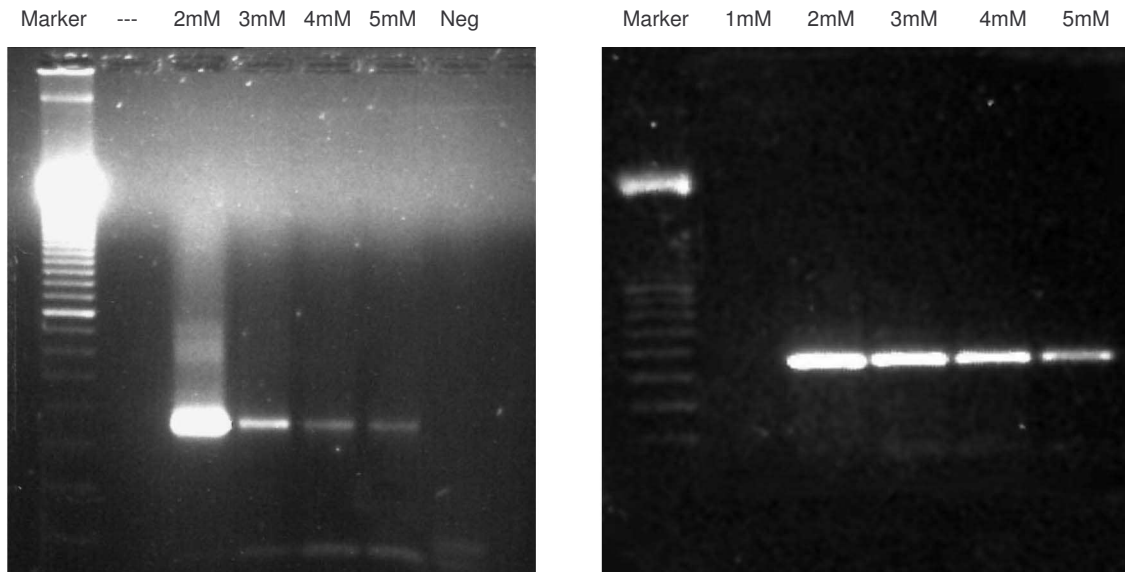


Abb.22 Gelelektrophorese von PCR-Produkten mit unterschiedlichen $MgCl_2$ -Konzentrationen nach 50 Cyclen. Marker = 100bp Marker. --- = ungefüllte Tasche. Werte geben die $MgCl_2$ -Konzentrationen an. Neg = Negativkontrolle. Links: β -Actin-PCR; rechts: bFGF-PCR.

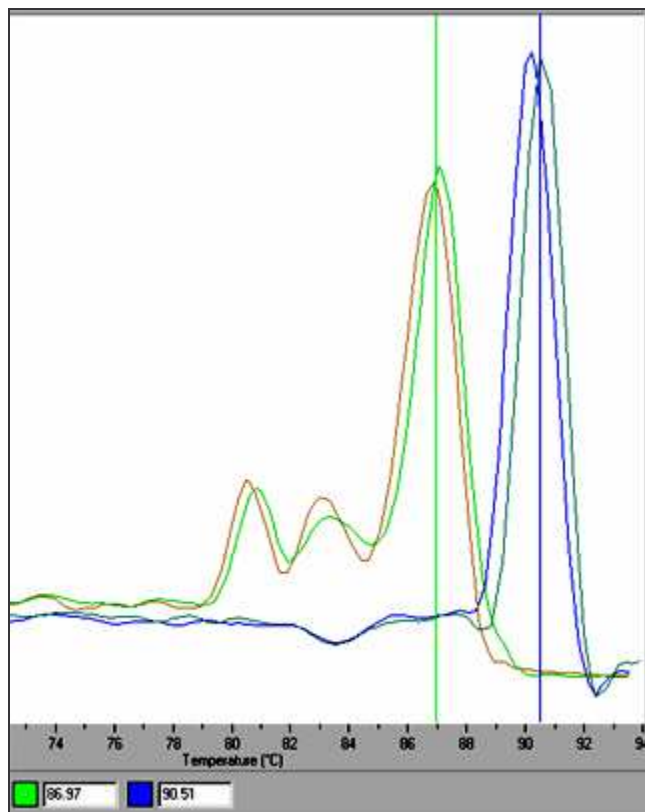


Abb.23 Schmelzkurve nach Light-Cycler-PCR, wobei die erste negative Ableitung der Fluoreszenzintensität (-df) gegen die Temperatur (dT) dargestellt ist. β -Actin zerfällt spezifisch bei einer Temperatur von 90,5 °C (grüne Kurve = Reamplifikationsprodukt; blaue Kurve = EC cDNA). bFGF zerfällt spezifisch bei einer Temperatur von etwa 87 °C (hellgrüne Kurve = Reamplifikationsprodukt; rote Kurve = EC cDNA).

3.3.2 Sequenzierung von β -Actin und bFGF

Die Sequenzierung von β -Actin ergab eine Übereinstimmung von 96,3% mit bovinem β -Actin. Die bFGF-Sequenzierung ergab eine Übereinstimmung mit bovinem bFGF von 97,3% (Übereinstimmungen der Sequenzierungsdaten wurden von European Molecular Biology Laboratory, EMBL FASTA Server, Heidelberg untersucht).

3.3.3 Verdünnungsreihe von β -Actin

Um eine quantitative Aussage der einzelnen Versuchsproben treffen zu können, wurde eine als Bezugspunkt dienende Verdünnungsreihe mit β -Actin hergestellt werden. Diese Verdünnungsreihe zeigte einen Korrelationskoeffizient von $r = -1,00$ bei einer Standardabweichung von 0,0595 (Abb.24) und wurde so zur quantitativen PCR in den Versuchen eingesetzt. Die Gelelektrophorese ergab bis zur kleinsten Verdünnung (10^{-4}) spezifische Banden für β -Actin (Abb.25).

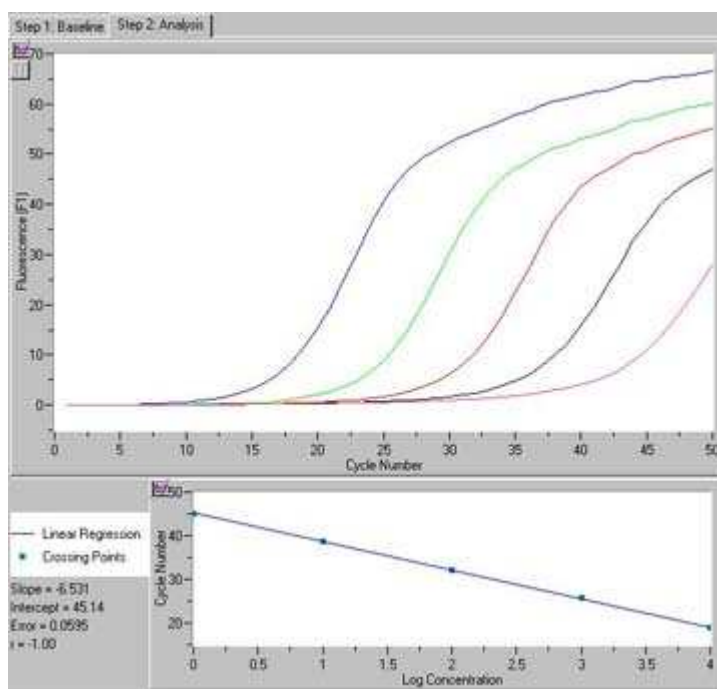


Abb.24 LightCycler β -Actin-PCR als Verdünnungsreihe. Oberer Graph zeigt die Fluoreszenz während der PCR: blaue Kurve = 1:1; grüne Kurve = 10^{-1} ; rote Kurve = 10^{-2} ; schwarze Kurve = 10^{-3} ; rosa Kurve = 10^{-4} . Unterer Graph zeigt die logarithmische Konzentration in Regression.

Marker --- 1:1 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4}



Abb.25 Gelelektrophorese von β -Actin LightCycler-PCR. Marker = 100bp Marker; --- = ungefüllte Tasche; Zahlen geben die Verdünnungen von β -Actin wieder. PCR nach 50 Zyklen.

3.3.4 Bestimmung der bFGF mRNA Expression

3.3.4.1 Bestimmung der bFGF mRNA Expression von Endothelzellen

Um festzustellen, ob die Anwesenheit von unbehandelter ECM (KO), PDT behandelter ECM (PDT), nur mit Laser bestrahlter ECM (LO), ECM, die nur dem CASPc ausgesetzt war (DT) und von reinem Zellkulturplastik (PL) mit einem spezifischen Effekt auf die Expression von bFGF mRNA von EC bzw. SMC einher geht, wurde die Konzentration der bFGF mRNA in Bezug zu β -Actin 12, 24 und 48 Stunden nach Aufgabe der Zellen auf die entsprechend vorbehandelten 6-Well-Platten mittels quantitativer RT-PCR bestimmt.

Nach 12 Stunden ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für die EC in allen untersuchten Gruppen (Abb.26,30; Tab.5).

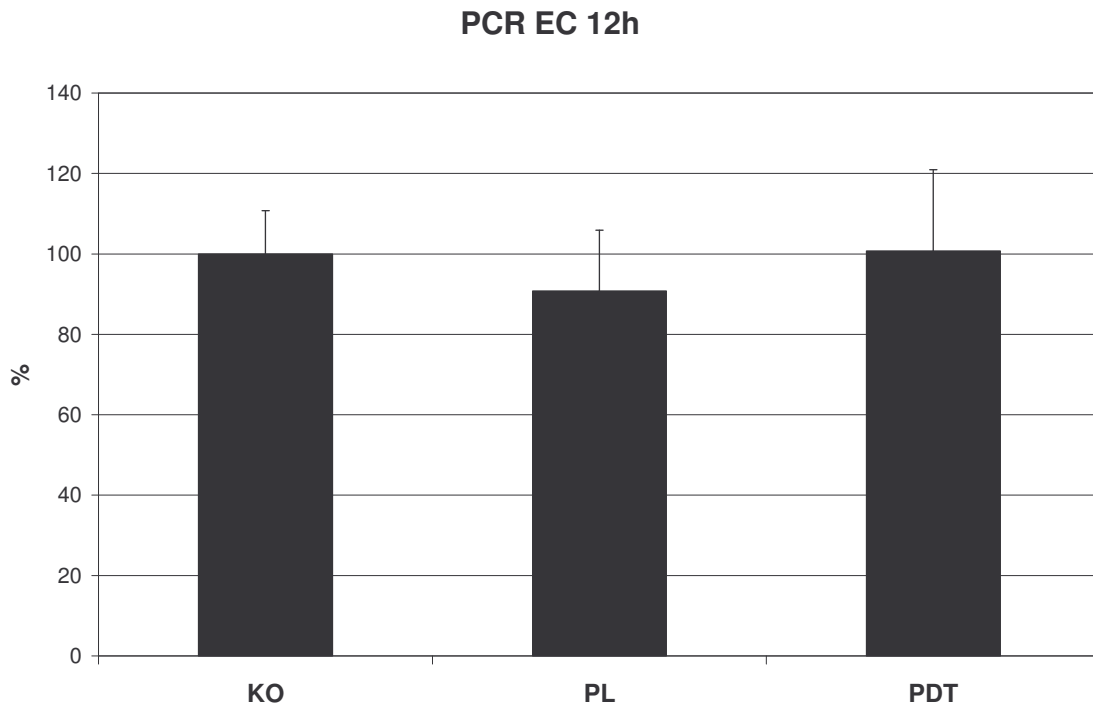


Abb.26 Quantitative PCR der bFGF mRNA von EC nach 12h Wachstum auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt.

Nach 24 Stunden zeigten die EC auf PDT behandelter ECM eine signifikant erhöhte mRNA Expression von bFGF auf 147% gegenüber KO. Auch die EC auf PL ergaben eine signifikante Hochregulation der bFGF mRNA Expression auf 170% verglichen mit KO. Die EC der Gruppe DT und LO zeigten keine signifikanten Änderungen in Bezug zu den EC auf unbehandelter ECM (Abb.27,28,30; Tab.5).

48 Stunden nach Aufgabe der EC ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für die untersuchten Gruppen (Abb.28,30; Tab.5).

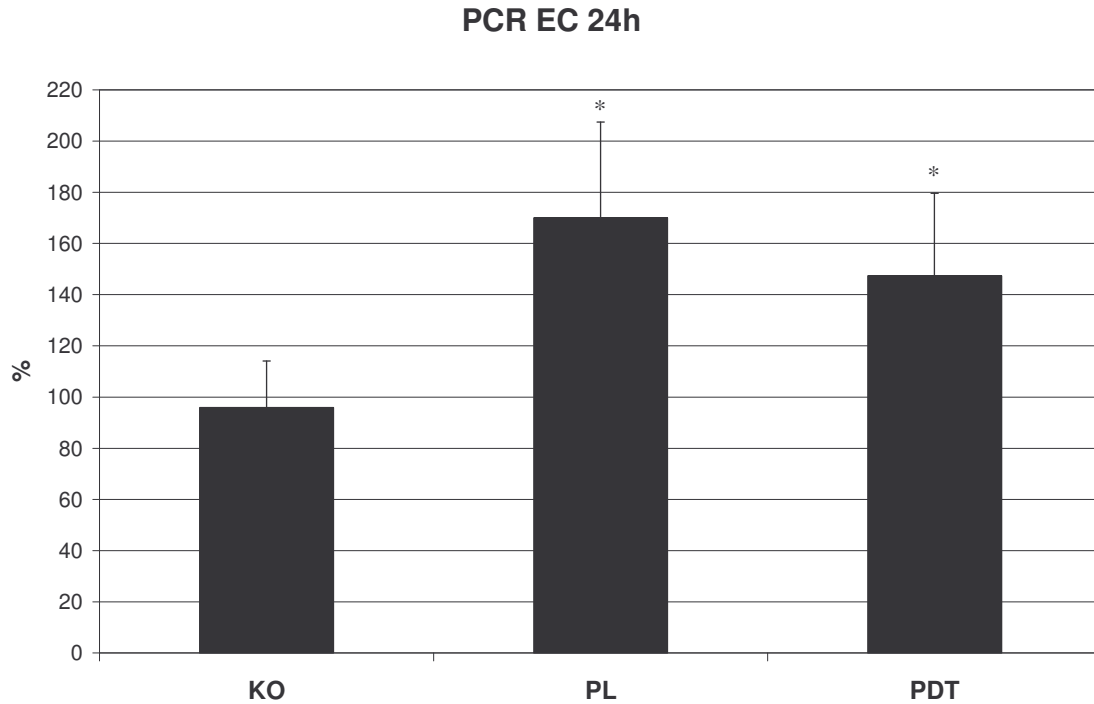


Abb.27 Quantitative PCR der bFGF mRNA von EC nach 24h Wachstum auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt. * Signifikanter Unterschied im Vergleich zu KO ($p < 0,05$).

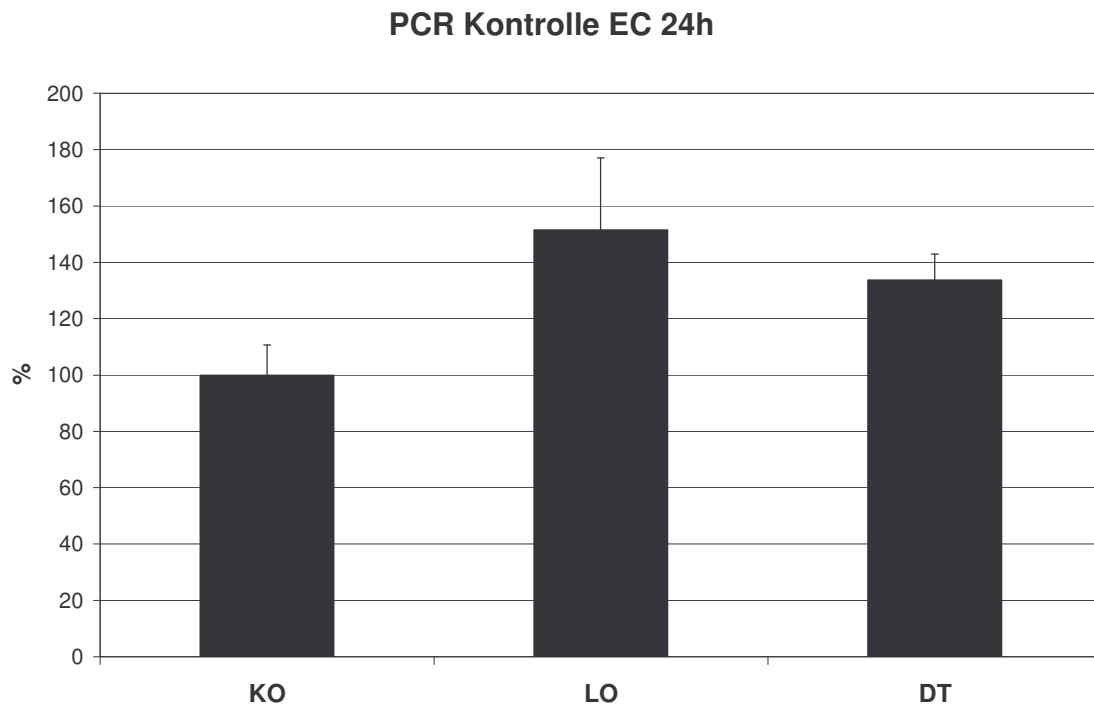


Abb.28 Quantitative PCR der bFGF mRNA von EC nach 24h Wachstum auf unbehandelter ECM (KO), nur mit Laser bestrahlte ECM (LO), nur mit CASPc behandelte ECM (DT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt. * Signifikanter Unterschied im Vergleich zu KO ($p < 0,05$). KO wurde zur Bestimmung von LO und DT erneut aufgetragen, weshalb die Werte für KO in Abb. 26 und 27 nicht identisch sind.

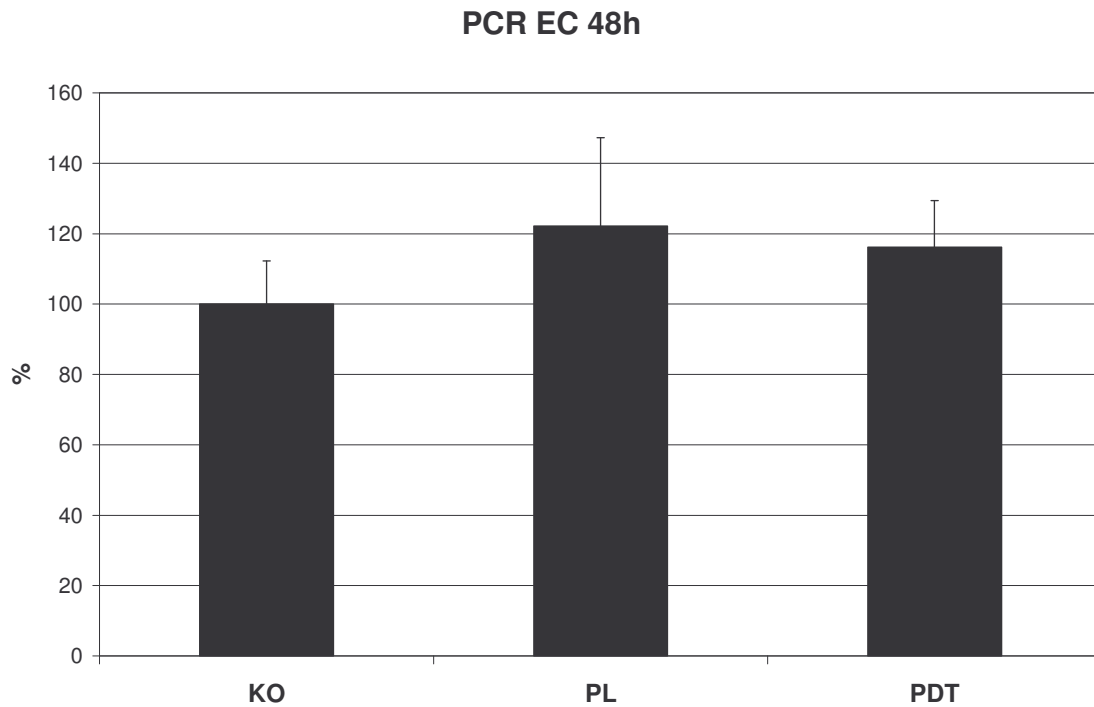


Abb.29 Quantitative PCR der bFGF mRNA von EC nach 48h Wachstum auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt.

Zeitpunkt	Gruppe	Anzahl n	Mittelwert %	SD	p vs. KO
12 Stunden	PDT	9	101	20,2	n.s.
	KO	9	100	10,8	
	PL	7	91	15,1	n.s.
24 Stunden	PDT	8	147	32,3	<0,005
	KO	9	96	18,2	
	PL	9	170	37,5	<0,0002
24 Stunden	LO	4	152	25,6	n.s.
	KO	6	100	10,6	
	DT	5	134	9,3	n.s.
48 Stunden	PDT	7	116	13,2	n.s.
	KO	9	100	12,3	
	PL	7	122	25,1	n.s.

Tab.5 bFGF mRNA Konzentrationen von EC auf verschieden behandelten 6-Well-Platten. p-Werte sind in Bezug zu KO und sind bei Werten <0,05 signifikant; nicht signifikant (n.s.). (n) gibt die Anzahl der Versuche wieder. EC auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM(PL), PDT behandelter ECM (PDT), nur mit Laser bestrahlte ECM (LO), nur mit CASPc behandelte ECM (DT).

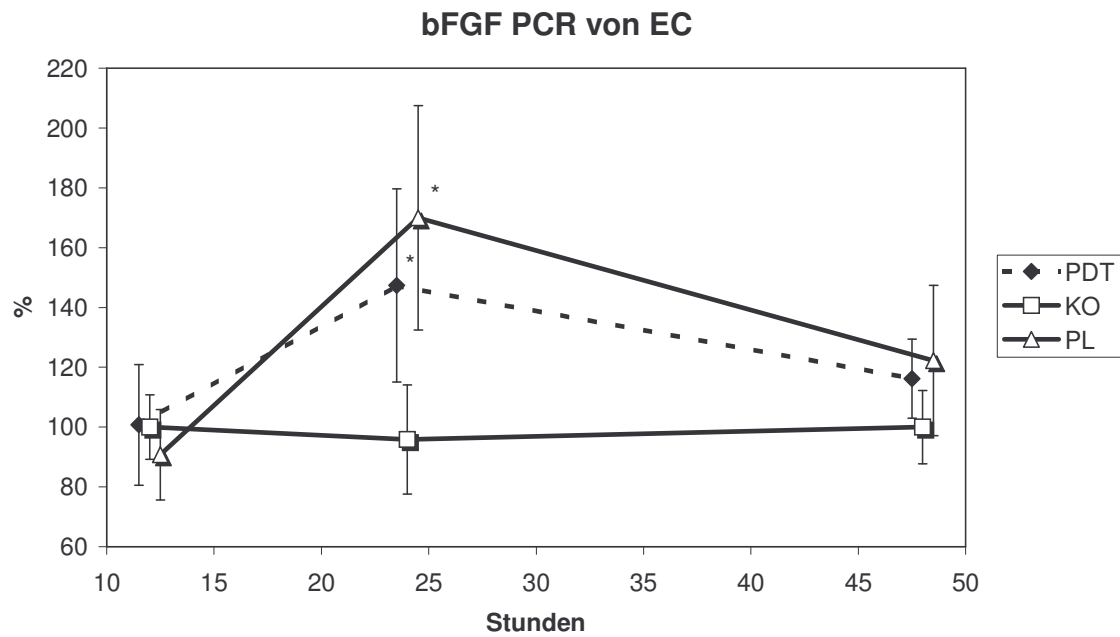


Abb.30 Quantitative PCR der bFGF mRNA von EC nach 12, 24 und 48 h auf verschieden behandelten 6-Well-Platten. EC auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt. Werte von PDT und PL sind bei 24h signifikant (*) gegenüber KO.

3.3.4.2 Bestimmung der bFGF mRNA Expression von glatten Muskelzellen

12 Stunden nach Inkubation der SMC auf den verschieden behandelten Matrices waren keine spezifischen Produkte unter den verwendeten PCR Bedingungen zu amplifizieren und kommen deshalb hier nicht zur Darstellung.

Die SMC zeigten nach 24 Stunden Wachstum auf PDT behandelter ECM keine signifikanten Expressionsänderungen der bFGF mRNA gegenüber den SMC auf unbehandelter ECM. Die SMC auf Zellkulturplastik zeigten eine signifikant verstärkte Expression der bFGF mRNA sowohl gegenüber SMC auf unbehandelter ECM auf 194%, als auch gegenüber SMC auf PDT-behandelter ECM ($p = 0,0039$) (Abb.31,33; Tab.6).

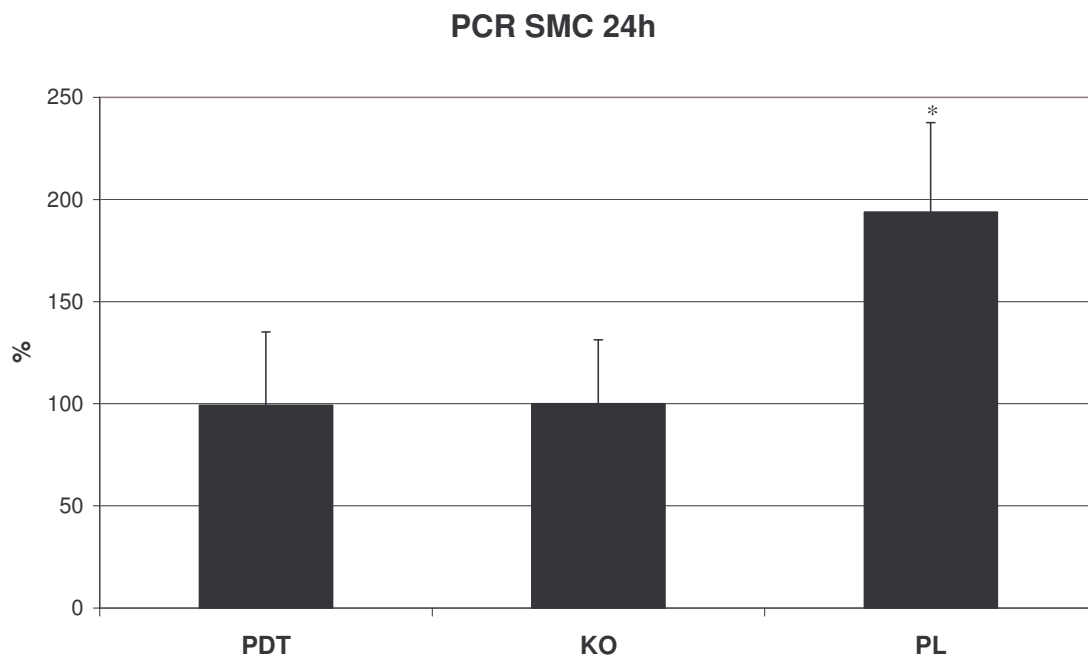


Abb.31 Quantitative PCR der bFGF mRNA von SMC nach 24h Wachstum auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt. * Signifikanter Unterschied im Vergleich zu KO ($p < 0,05$).

Auch nach 48 Stunden ergaben sich für die SMC auf PDT behandelter ECM keine signifikanten Änderungen in bezug zu den SMC auf unbehandelter ECM. Die SMC auf 6-Well-Platte ohne ECM zeigten auch zu diesem Zeitpunkt eine signifikant erhöhte bFGF mRNA Expression auf 162% gegenüber den SMC auf unbehandelter ECM (Abb.32,33; Tab.6).

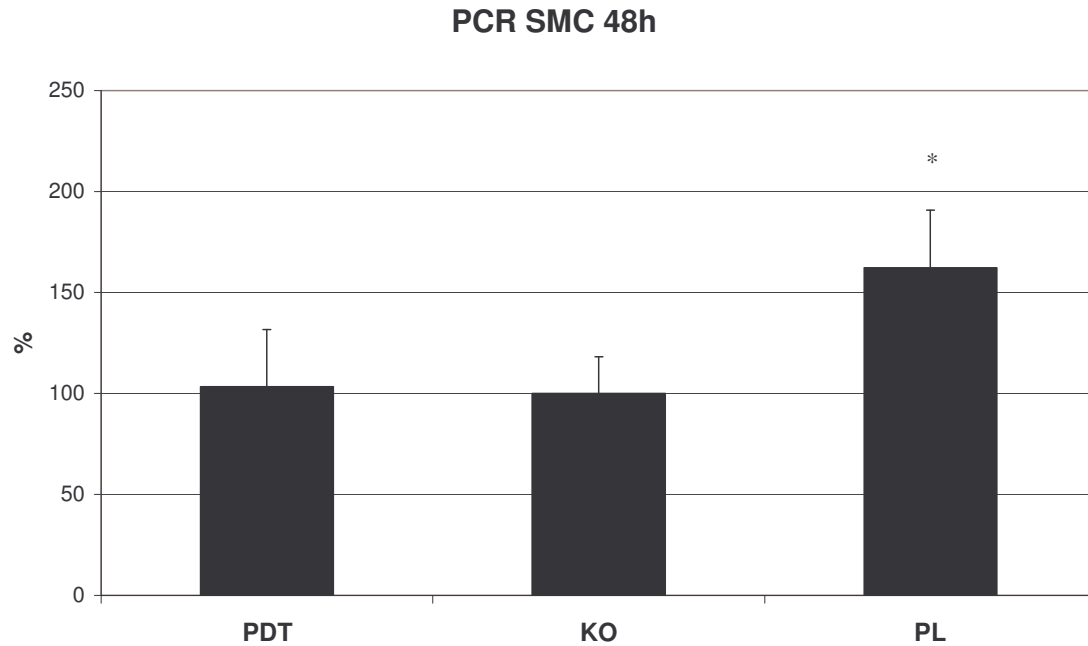


Abb.32 Quantitative PCR der bFGF mRNA von SMC nach 48h Wachstum auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt. * Signifikanter Unterschied im Vergleich zu KO ($p < 0,05$).

Zeitpunkt	Gruppe	Anzahl n	Mittelwert %	SD	p vs. KO
24 Stunden	PDT	6	99	35,6	n.s.
	KO	5	100	31,3	
	PL	5	194	43,8	<0,005
48 Stunden	PDT	8	103	29,2	n.s.
	KO	9	100	18,2	
	PL	8	162	46,1	<0,005

Tab.6 bFGF mRNA Konzentrationen von SMC auf verschieden behandelten 6-Well-Platten. p-Werte sind in Bezug zu KO und sind bei Werten $<0,05$ signifikant; nicht signifikant (n.s.). (n) gibt die Anzahl der Versuche wieder. SMC auf unbehandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT).

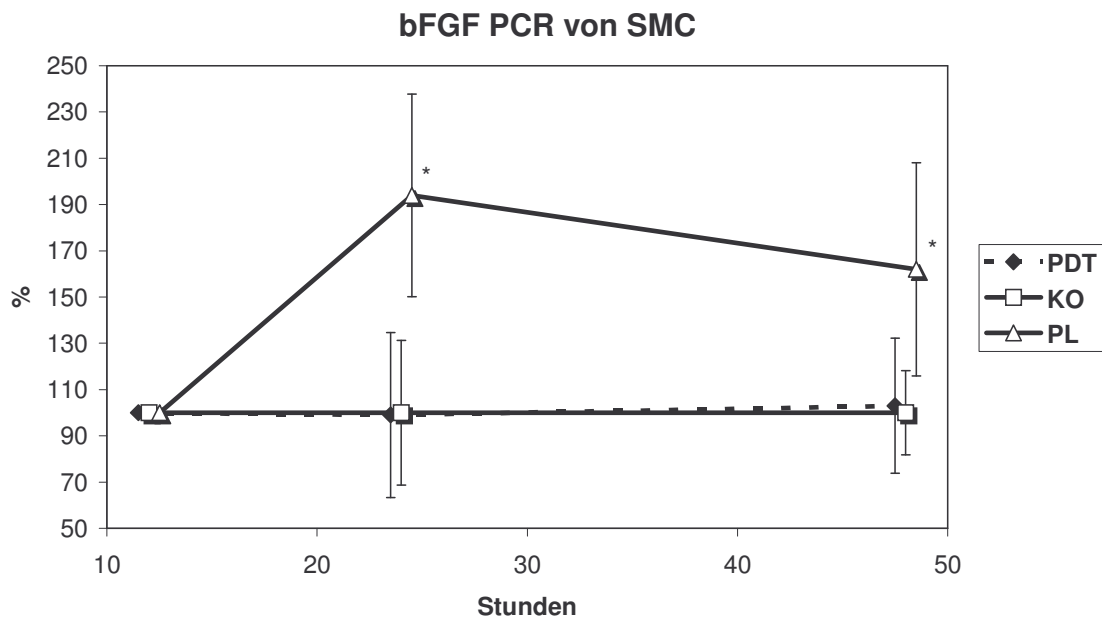


Abb.33 Quantitative PCR der bFGF mRNA von SMC nach 12, 24 und 48 h auf verschieden behandelten 6-Well-Platten. SMC auf un behandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT). Die Ergebnisse sind als Mittelwert in Prozent \pm SD und in Bezug zu KO dargestellt. Werte von PL sind bei 24 und 48h signifikant (*) gegenüber KO.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Methodik	Gruppe	12h	24h	48h	72h
EC Proliferation	KO		=	=	=
	PDT		↑	↑	↑
	PL		↑	↑	↑
EC bFGF-mRNA Expression	KO	=	=	=	
	PDT	=	↑	=	
	PL	=	↑	=	
SMC Proliferation	KO		=	=	=
	PDT		↓	↓	↓
	PL		↓	↓	↓
SMC bFGF-mRNA Expression	KO	=	=	=	
	PDT	=	=	=	
	PL	=	↑	↑	

Tab.7 Zusammenfassung der verschiedenen Befundänderungen von EC und SMC auf verschieden behandelten 6-Well-Platten. EC bzw. SMC auf un behandelter ECM (KO), 6-Well-Platte ohne ECM (PL), PDT behandelter ECM (PDT). Die Ergebnisse sind zum jeweiligen Zeitpunkt und in Bezug zu KO dargestellt.; (=) keine Veränderung; (↑) signifikante Zunahme; (↓) signifikante Abnahme.

4 Diskussion

4.1 Diskussion des Versuchsaufbaus

4.1.1 Zellkulturbedingungen

Zur Durchführung der Versuche wurden aortale, bovine EC und SMC benutzt. Humane Gefäßzellen werden meist aus der Vena saphena magna isoliert, ein Gefäß, welches als Implantat bei Bypass-Operationen verwendet wird. Diese Zellen bedürfen dem Zusatz von Wachstumsfaktoren, um in Kultur gehalten werden zu können. Außerdem ist das Infektionsrisiko verglichen mit bovinen Zellen erhöht und das biologische Verhalten der Zellen je nach Spender unterschiedlich. Das bovine System ist sehr gut charakterisiert und wird schon jahrelang zu experimentellen Zwecken eingesetzt [Grunwald et al., 1984; Adili et al., 1996]. Die für die Isolation benutzten Aorten konnten einmal in der Woche und in großen Stückzahlen am örtlichen Schlachthof bezogen werden. Die Handhabung der Zellen ist relativ einfach und benötigt für ein adäquates Wachstum keinen Zusatz von Wachstumsfaktoren. Zusätzliche Wachstumsfaktoren, die zur Züchtung von humanen Zellen nötig wären, können das Wachstum und das Verhalten der zu untersuchenden Zellen auf der ECM beeinflussen. Die Zellen wurden ausschließlich von der zweiten bis zur fünften Passage verwendet, um einer Entdifferenzierung der Zellen vorzubeugen.

Zur Durchführung der Bestimmung der bFGF mRNA Expression wurden die gleichen Zellen und die gleiche ECM wie bei den Proliferationsbestimmungen verwendet. Da Heparin die Gen-Expression von EC beeinflusst [Lupu et al., 1999], auf der anderen Seite aber zur Isolation von EC notwendig ist, um das Wachstum eventuell vorhandener SMC zu unterdrücken, wurde dem Medium erst ab der ersten Passage kein Heparin mehr zugeführt.

Um möglichst isoliert die Effekte der PDT-behandelten ECM auf die Zellen zu untersuchen, wurde dem Medium der Zellen nur 0,5% FCS beigemischt, da höhere FCS-Konzentrationen auch weitere exogene Wachstumsfaktoren enthalten und die Effekte der ECM eventuell überdecken könnte. Diese Bedingungen entsprechen sicher nicht den in-vivo herrschenden Verhältnissen, wo über den Blutfluss eine Vielzahl von Wachstumsmediatoren angeflutet werden. Da aber bekannt ist, daß die

Kulturbedingungen Einfluss auf das Wachstums-, aber besonders auch auf das Syntheseverhalten der Zellen haben [Gospodarowicz et al., 1980], wurde ein geringer FCS-Anteil im Medium gewählt

4.1.2 Extrazelluläre Matrix von Endothelzellen

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten den Einfluß der ECM zu untersuchen. Eine Möglichkeit ist, ECM synthetisch mit den Hauptbestandteilen Kollagen (Typ IV), Glykoproteinen (Laminin, Fibronectin, Entaktin) und sauren Proteoglykanen (Heparansulfat) herzustellen. Eine andere Möglichkeit ist, die von Zellen synthetisierte ECM zu isolieren.

Der Vorteil der ECM- Isolation von EC ist, daß EC eine ECM produzieren, die ein dreidimensionales Netzwerk bildet, was in seiner Organisation und makromolekularen Zusammensetzung dem natürlich vorkommenden Subendotheliums sehr ähnlich ist [Korner et al., 1993]. Die ECM fungiert dabei nicht nur als träge strukturelle Stütze, sondern reguliert zusätzlich das Anheftungsverhalten, die Proliferation, die Migration und die Differenzierung von Zellen. Die resultierenden Effekte auf das Zellverhalten sind zum großen Teil der Zusammensetzung und dreidimensionalen Struktur der ECM zuzuschreiben. Diese ECM erlaubt eine Veränderung der Zellstruktur und den Einfluß von physiologisch vorkommenden Hormonen und Wachstumsfaktoren [Vlodavsky et al., 1987]. In vielen Fällen zeigte sich, daß isolierte Matrixkomponenten, auch in verschiedenen Kombinationen und als dreidimensionale Gelmatrix, der biologischen Eigenschaften der natürlich produzierten ECM nicht gerecht werden [Fridman et al., 1985]. So spiegelt die in den Versuchen dieser Arbeit eingesetzte ECM das multiredundante System der in-vivo Situation am ehesten wieder.

Der Nachteil an dieser Vorgehensweise ist, daß die genaue Zusammensetzung der einzelnen Matrices nicht bekannt und inkonstant ist und somit gewisse Unterschiede in der Quantität und Qualität der ECM-Bestandteile bestehen können. Aus diesem Grund wurde eine größere Anzahl an Experimenten durchgeführt.

4.1.3 Basic Fibroblast Growth Factor

Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) gehört zu einer Gruppe von zur Zeit 23 bekannten, strukturell miteinander verwandten Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren [Cordon-Cardo et al., 1990]. Die im Zytoplasma gespeicherte und sezernierte Form von bFGF ist ein 18kDa großes, aus 155 Aminosäuren bestehendes, nicht-glykosyliertes Polypeptid, welches sowohl inter- als auch extrazelluläre Aktivität zeigt [Florkiewicz et al., 1995]. Daneben sind noch weitere Formen von bFGF mit höherem Molekulargewicht zwischen 22kDa und 34kDa im Zellkern nachgewiesen worden, welche sich in ihrer Funktion nicht vom 18kDa bFGF unterscheiden [Bugler et al., 1991; Arnaud et al., 1999]. Das Vorkommen von bFGF im Gewebe ist ubiquitär. So konnte es unter anderem in viszeralen und vaskulären SMC, EC [Cordon-Cardo et al., 1990], Thrombozyten [Martyre et al., 1997], Fibroblasten und in der ECM [Aktas et al., 2000] nachgewiesen werden.

Die Wirkung von bFGF ist vielfältig. So spielt bFGF unter anderem in der Angiogenese [Gerwins et al., 2000] und der Tumorgenese [Galzie et al., 1997] eine große Rolle. Außerdem besitzt bFGF große mitogene Aktivität sowohl für EC als auch für SMC [Connolly et al., 1987; Winkles et al., 1987].

Da bFGF bei der Entstehung von IH und dem Auftreten von Restenosen eine große Rolle spielt [Nabel et al., 1993] und ein etablierter, biologisch wichtiger Wachstumsfaktor ist, konzentrierten sich schon vorangegangene Untersuchungen auf bFGF [LaMuraglia et al., 1997; van Eps et al., 1997c].

Der Wachstumsfaktor bFGF wird als „Wundhormon“ angesehen, welches Gewebeheilung nach Verletzung initiiert. Es ist daher naheliegend, daß bFGF auch ein wichtiger Mediator bei der proliferativen Reaktion der SMC nach Gefäßverletzung ist, indem er die SMC Proliferation nach Verletzung mitverursacht [Lindner et al., 1991; Reidy et al., 1992]. Verletzungen der Gefäßwand durch Ballonangioplastie, aber auch Schäden durch Hitzeeinwirkung [Douek et al., 1992], Stentimplantation [Bai et al., 1994] oder durch Gammabestrahlung [Heckenkamp et al., 1999] gehen mit weitreichender Zellvernichtung einher, die in einer gesteigerten SMC Proliferationsantwort resultiert. Es wurde gezeigt, dass mechanisch verletzte EC bFGF ausschütten, welches an der ECM bindet und einen langanhaltenden Proliferationsstimulus für SMC darstellt [Folkman et al., 1988]. Dabei zeigte sich auch, daß das Ausmaß der SMC-Proliferation und die folgende intimale Neubildung

proportional zum Grad der Gefäßschädigung ist [Fingerle et al., 1990; Indolfi et al., 1995]. Daß bFGF in dieser Reaktion auf die Verletzung der Gefäßwand eine große Rolle spielt, konnte durch die Beobachtung belegt werden, daß die SMC-Proliferation durch anti-bFGF-Antikörper gehemmt [Lindner et al., 1991] und neointimale Veränderungen nach Ballonangioplastie unterdrückt werden können [Nguyen et al., 1994].

Neben der Tatsache, daß bFGF aus geschädigten oder zerstörten Zellen freigesetzt wird, konnte gezeigt werden, daß es auch in monomerer Form sezerniert wird [Engleka et al., 1992]. Über den genauen Sekretionsmechanismus für bFGF ist bislang nicht viel bekannt. Sicher ist, dass bFGF keine hydrophobe Signalsequenz für die sekretorische Ausschleusung über das endoplasmatische Retikulum (ER) - Golgi - System besitzt [Mignatti et al., 1992; Abraham et al., 1986]. Es konnte aber gezeigt werden, daß die 18kDa Form von bFGF über eine ATP-abhängige, vom ER-Golgi-System unabhängige, Exozytose von Zellen sezerniert wird [Florkiewicz et al., 1995; Yu et al., 1993].

Im Rahmen der Entwicklung von Restenosen nach Gefäßverletzung könnte die Möglichkeit der aktiven Sekretion von autokrinen Wachstumsfaktoren wie bFGF eine bedeutende Rolle spielen [Stouffer et al., 1998]. Studien belegen, daß sich Zellen durch die Exozytose von bFGF autokrin stimulieren können [Mignatti et al., 1991].

Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, daß durch PDT sowohl matrixassoziiertes bFGF [LaMuraglia et al., 1997] als auch zellassoziiertes bFGF [van Eps et al., 1997c] eliminiert werden kann. Auch konnte gezeigt werden, daß durch die Zerstörung von Zellen mittels PDT kein bFGF freigesetzt wird [Heckenkamp et al., 1999].

Eine Stimulation der Zellen nach PDT kann somit nicht oder zumindest nur in geringem Maße durch matrixassoziiertes bFGF stattfinden. Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um die Bedeutung der Eliminierung von bFGF nach PDT für das Remodeling aufzudecken. Hierzu wurde erstmalig die mRNA Expression von bFGF in EC und SMC nach PDT von extrazellulärer Matrix untersucht. Die Untersuchung von bFGF in dieser Arbeit wurde gewählt, da bFGF eines der bekanntesten Mitogene ist. Dieser Wachstumsfaktor sollte beispielhaft für weitere wachstumsbeeinflussende Proteine fungieren und so zum Aufschluß des Pathomechanismus nach PDT beitragen.

4.1.4 Versuchszeitpunkte

Die verwendeten Zeitpunkte (12, 24, 48 und 72 Stunden) der Versuche wurden gewählt, da die Kurzzeiteffekte und deren zeitliche Kinetik von PDT der ECM auf EC bzw. SMC gezeigt werden sollten. Die SMC-Proliferationsrate liegt normalerweise bei 1%, diese erhöht sich im Tierexperiment bis über 20% innerhalb der ersten 48h nach Verletzung eines Gefäßes [Clowes et al., 1983; Clowes et al., 1985; Hanke et al., 1990]. Dies ändert sich bis zum dritten Tag nicht.

Die EC- und SMC-Proliferation wird hierbei maßgeblich über den Wachstumsfaktor bFGF gesteuert [Lindner et al., 1990; Lindner et al., 1991]. Arbeitsgruppen [Nguyen et al., 1994; Randone et al., 1998] untersuchten die Wirkung von polyclonalen anti-bFGF Antikörpern und deren zeitliche Relevanz auf die Entstehung von Intimahyperplasie. Die tägliche intravenöse Gabe von polyclonalen anti-bFGF Antikörpern bis zum fünften Tag nach Ballonverletzung zeigte eine anhaltend (untersuchter Zeitraum bis 14 Tage nach Ballonverletzung) signifikante Hemmung von IH in Kaninchen [Nguyen et al., 1994]. Sogar die Applikation von polyclonalen anti-bFGF Antikörpern über nur zwei Tage nach abdominalen Aortenprothesen-Implantation in Ratten reichte aus, um die Proliferation von SMC signifikant zu hemmen [Randone et al., 1998]. Die proliferative Wirkung von bFGF ist demnach in den ersten 48h am relevantesten. Eine günstige Modulation der Zellfunktionen, bzw. des intrazellulären bFGF's und damit der Proliferation in diesem Zeitraum könnte folglich die Entstehung der IH vermindern bzw. verhindern.

Anhand der Proliferationsdaten wurden die Zeitpunkte der mRNA-Isolation so gewählt, daß eventuelle Änderungen der bFGF mRNA Expression, die dem gesteigerten bzw. verminderten Wachstum zugrunde liegen, erfaßt werden konnten. Der Zeitpunkt 12 Stunden wurde gewählt, um vor dem Anstieg des Wachstums nach 24 Stunden zu liegen. Die Zeitpunkte 24 und 48 Stunden, um die Kinetik der mRNA Expression zu erhalten und um den 72 Stunden Referenzzeitpunkt des Proliferations-Assays abzudecken.

4.1.5 Photosensitizer CASPc

PDT wurde anfangs wegen seines lokalisierten cytotoxischen Effekts vor allem zur Behandlung von malignen Erkrankungen eingesetzt [Pass et al., 1993]. Der einzige zur Zeit von der U.S. Food and Drug Administration für klinische PDT zugelassene Photosensitizer ist Photofrin II [Oleinick et al., 1998]. Photofrin II, ein Photosensitizer der ersten Generation, gehört zur Gruppe der Hematoporphyrinderivate (HpD) und besteht aus einem komplexen Gemisch aus Porphyrinmonomeren und Oligomeren, die sich von Hematoporphyrin ableiten [Oleinick et al., 1998]. Auch im Rahmen der vaskulären PDT zur Therapie von IH wurde Photofrin II im Tierversuch erfolgreich evaluiert [Eton et al., 1996]. Trotz der nachgewiesenen Wirksamkeit und des breiten Einsatzes von Photofrin II, sind die Eigenschaften dieses Photosensitzers nicht ideal [Oleinick et al., 1998]. So ist die komplexe chemische Struktur nicht genau definiert und es herrscht Uneinigkeit darüber, was die eigentlich aktive Komponente ist [Bown et al., 1986]. Auch sind die schwache Lichtabsorption (molarer Extinktionskoeffizient $[\epsilon] = 3.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) mit Licht der Wellenlänge 630nm sowie die Tendenz sich in der Haut zu akkumulieren, ungünstige Eigenschaften [Oleinick et al., 1998]. Mit dem Einsatz von PDT gegen neoplastische und andere proliferative Störungen wurden neue Photosensitizer mit weniger Nebenwirkungen entwickelt. Im Vergleich mit den traditionell benutzten Hematoporphyrin Derivaten, welche zur Zeit in der klinischen Evaluation als Mittel gegen maligne Erkrankungen im dermatologischen, endobronchialen, ösophagealen, gastrointestinalen, genitourinalen und gynäkologischen Bereich, sowie im Gebiet der HNO sind, haben die Photosensitizer der zweiten Generation, wie CASPc, deutliche Vorteile. Sie haben ohne Lichtaktivierung eine geringere Toxizität gegenüber HpD in-vitro und erzeugen unter Bestrahlung eine erhöhte Cytotoxizität mit geringeren systemischen Nebenwirkungen als HpD in-vivo [Koshida et al., 1993]. So hat CASPc im Vergleich zu Photofrin II eine bessere Lichtabsorption (molarer Extinktionskoeffizient $[\epsilon] = 8.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), wird mit Licht der Wellenlänge von 675nm erregt und hat als angeregter Triplet-Zustand eine Überlebenszeit von etwa 510 μ s [Bown et al., 1986]. CASPc bindet spezifisch an Albumin und andere Proteine [Rosenthal et al., 1991] und wird in Tumoren bis zu fünfmal stärker gespeichert als Photofrin II [Roberts et al., 1991]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CASPc in IH-Gewebe bevorzugt angereichert wird [LaMuraglia et al., 1993]

Im Gewebe nimmt die Lichtpenetration exponential mit der Strecke ab. Dabei ist die effektive Penetrationstiefe \propto umgekehrt proportional zum effektiven Verdünnungskoeffizienten ($\alpha = 1/\epsilon$ Tiefe) [Lambert-Beersches Gesetz]. Im Durchschnitt ist die Penetrationstiefe bei einer Wellenlänge von 630nm ca. 1-3mm, diese verdoppelt sich bei einer Wellenlänge von 700-850nm. So wird bei dem Einsatz von Photofrin II mit 630nm [Oleinick et al., 1998] sowie 5-Aminolaevolinsäure mit 635nm [Jenkins et al., 1999] eine Penetrationstiefe von 1-3mm erreicht. CASPc wird mit Licht einer Wellenlänge von 675nm aktiviert, wodurch eine tiefere Gewebepenetration von 2-6mm ermöglicht wird [Bown et al., 1986]. Aufgrund der klaren Vorteile der Metallo-Phthalocyanine wird der Einsatz von Antrin (Motexafin lutetium), einem weiteren Vertreter der Metallo-Phthalocyanine, für die vaskuläre PDT zur Zeit in klinischen Phase-II Studie evaluiert [Sessler et al., 2000; Rockson et al., 2000]. Antrin hat mit 742nm eine noch günstigere Aktivierungswellenlänge [Rockson et al., 2000], was für den klinischen Einsatz im Bereich der vaskulären PDT von Vorteil ist. Die tiefere Gewebepenetration des Lichts ist bei der Behandlung von Restenosen von Vorteil, da so nicht nur lumennahe Strukturen des Gefäßes bestrahlt werden, sondern auch tiefer gelegene Gefäßabschnitte. Gerade aus den tiefer gelegenen Abschnitten (Media und Adventitia) des Gefäßes proliferieren und migrieren Zellen bei der Entstehung einer Restenose [Scott et al., 1996].

CASPc wurde in den letzten Jahren sowohl zu in-vivo, als auch zu in-vitro Untersuchungen verwendet, um den zugrunde liegenden Mechanismen von PDT zur Verhinderung von Restenosen aufzudecken [LaMuraglia et al., 1993, 1994, 1995, 2000; Adili et al., 1995, 1996; Heckenkamp et al., 1999; van Eps et al., 1997a,b,c; 1999]. Damit ist CASPc einer der wohl am besten charakterisierten Photosensitizer im Zusammenhang mit vaskulärer PDT. Dabei hat CASPc den Nachteil, daß es bisher noch nicht im klinischen Einsatz ist.

4.1.6 mRNA- Isolation

Bei der Gewinnung der RNA aus den Zellen wurde nicht Gesamt-RNA isoliert, sondern mRNA. Dies hat den Vorteil, daß mit einer höheren Wahrscheinlichkeit genomische Kontaminationen ausgeschlossen werden können.

In dieser Arbeit wurden für β -Actin Primer-Sequenzen der Arbeitsgruppe Asselin verwendet, die nach Amplifikation von Gesamt-RNA aus bovinen Uterus-Zellen eine spezifische Bande von 458bp aufwiesen [Asselin et al., 1997]. Mit den identischen Primer-Sequenzen wurde eine spezifische Bande von 352bp von mRNA aus bovinen aortalen EC und SMC amplifiziert. In einigen Zellarten findet ein so genanntes „alternatives Splicing“ statt, wobei kurze Basensequenzen entfernt werden. In anderen Zellarten des gleichen Organismus findet dieses „alternative Splicing“ eventuell nicht statt, woraus unterschiedlich lange mRNA-Sequenzen eines Gens in ein und demselben Organismus resultieren können. Da in den vorliegenden Versuchen mRNA zur Amplifikation eingesetzt wurde und andere Zellarten als die der Arbeitsgruppe Asselin zur Isolation verwendet wurden, ist das „alternative Splicing“ dieser Zellen nicht auszuschließen. Die Sequenzanalyse des amplifizierten Produkts durch das European Molecular Biology Laboratory (EMBL FASTA Server) ergaben eindeutige Übereinstimmungen mit bovinem β -Actin (Kapitel 3.3.2). Die Spezifität der β -Actin Amplifikation ist damit eindeutig.

4.1.7 LightCycler™

Bei der Verwendung des LightCyclers™ gibt es zwei verschiedene Methoden die Korrelation der Menge des PCR-Produkts darzustellen. Bei der einen wird das PCR-Produkt unter der Verwendung des SYBR Green I, welches doppelsträngige DNA bindet, als Fluoreszenzsignal dargestellt, bei der anderen wird das erwartete PCR-Produkt mit dem Einsatz von Hybridisierungsproben über sequenzspezifische Fluoreszenzen bestimmt. Das bei den Versuchen verwendete SYBR Green I hat den Nachteil gegenüber spezifischen Hybridisierungsproben, daß es mögliche unspezifische doppelsträngige Sequenzen, wie zum Beispiel Primerdimere, bindet und so ungewollte Fluoreszenzen freisetzt, die von der LightCycler™-Software nicht von den spezifischen

Fluoreszenzsignalen unterschieden werden können und so mit in die Quantifizierung eingehen können. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Amplifikations-Produkten zeigten die Schmelzkurven für β -Actin und bFGF eindeutige spezifische Signale ohne störende Sekundärfluoreszenzen von unspezifischen Produkten (*Abb.23*), wodurch der Nachteil des SYBR Green I in den vorliegenden Untersuchungen wahrscheinlich nicht relevant ist. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Expression von bFGF mRNA quantitativ mittels real-time PCR bestimmt. Die Etablierung einer quantitativen real-time PCR für das elementare Mitogen bFGF wurde bisher noch nicht beschrieben.

Bei der herkömmlichen Methode zur quantitativen Auswertung von PCR-Produkten muß die log-lineare Phase der Amplifikations-Produkte mit densitometrischen Bestimmungen für jedes Produkt und unter den jeweiligen PCR-Bedingungen ermittelt werden. Um PCR-Produkte in Korrelation zu ihrer Ausgangsmenge quantitativ bestimmen zu können, muß der PCR-Lauf jeweils genau zu den ermittelten log-linearen Zyklen unterbrochen werden. Die Amplifikations-Produkte werden in einem weiteren Arbeitsschritt durch Ethidium-Bromid-Gele sichtbar gemacht und die spezifischen Banden mittels densitometrischer Bestimmung quantifiziert. Jede PCR unterliegt bestimmten Schwankungen, dadurch könnte sich die log-lineare Phase verschieben und die Aussage der Quantifizierung beeinflussen. Durch das Detektionssystem des LightCyclers™ werden all diese Einzelschritte zu einem Arbeitsgang zusammengefaßt und die log-lineare Phase durch Einzelzyklusbetrachtung für jede Reaktion präzise identifiziert. Die Konzentration des Ausgangsproduktes wird, nachdem die PCR beendet ist, objektiv durch die LightCycler™-Software berechnet. Hinzu kommen die ultraschnellen Zykluszeiten, die zum Beispiel in 30 PCR Zyklen in weniger als 20 Minuten resultieren.

4.2 Bedeutung von bFGF für EC Funktionen nach PDT von ECM

4.2.1 Bestimmung der Proliferation von Endothelzellen nach Photodynamischer Therapie von extrazellulärer Matrix

Vorangegangene Studien konnten in unterschiedlichen Tierarten wiederholt zeigen, daß für die Entstehung von IH die ausgedehnte Zerstörung des Endothels in der Arterienwand selbst ausreicht. Nach experimentellen Angioplastien findet die Reendothelialisation des verletzten Gefäßes innerhalb von Wochen statt und kann vollständig oder unvollständig erfolgen [Clowes et al., 1989]. In den Abschnitten der luminalen Oberfläche, in denen die Besiedelung mit EC schnell erfolgt, entwickelt sich IH in geringeren Ausmaßen, als in Teilen, wo die endotheliale Regeneration später stattfindet [Clowes et al., 1989]. Die Regeneration des Endothels erfolgt eventuell beim Menschen verlangsamt oder nicht vollständig. In einer Studie [Gravanis et al., 1989] waren bei Patienten die innerhalb von einem Monat nach Angioplastie verstarben, keine EC am Ort der durchgeführten Angioplastie aufzufinden. Bei Patienten die länger überlebten, wurde hingegen die Besiedelung mit EC nachgewiesen. Den Einfluß der Reendothelialisierung auf IH wurde in einer Studie gezeigt, die eine inverse Beziehung zwischen Reendothelialisierung und der Proliferation neointimaler SMC verletzter Rattencarotiden nach Gabe von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) demonstrierten [Asahara et al., 1995]. Mehr als 96% PCNA- immunopositive Zellen, eine Markierung, welche Zellen in der S-Phase eines Replikationszykluses nachweist, wurden an den Stellen gefunden, an denen sich kein Endothelium ausgebildet hatte. IH entwickelt sich also in Verbindung mit einer verlangsamt Reendothelialisierung. Umgekehrt kann angenommen werden, daß eine beschleunigte Reendothelialisierung IH reduzieren könnte.

Frühere experimentelle Studien stützen die Annahme, daß einige Funktionen des Endotheliums - einschließlich Permeabilitätsregulation, Thrombogenität und Leukozytenadhärenz, sowie die Produktion von Wachstumsfaktoren und -inhibitoren - kritischen Einfluß auf die Prevention von IH haben [Hamon et al., 1994]. Aus diesem Grunde wurden neue Konzepte entwickelt, die sich mit einer beschleunigten Reendothelialisierung nach ballon-induzierter Gefäßverletzung auseinander setzen. [Asahara et al., 1995]. Nach Gabe von EC Mitogenen, wie bFGF, im Anschluß an eine

Verletzung eines Arteriensegmentes wurden begünstigende Reparatureffekte festgestellt. bFGF induzierte neben VEGF ein verstärktes Auswachsen von EC auf der zerstörten Oberfläche des Gefäßes und eine signifikant gesteigerte Reendothelialisierung.

Vorausgegangene in-vitro Studien konnten zeigen, daß EC, die auf PDT- behandelte Matrix gegeben wurden, eine erhöhte Migration und Mitogenese aufwiesen. [Adili et al., 1996]. Die vorliegende Studie sollte nun an diesen Ergebnissen anschließen und systematisch die Effekte von PDT auf die Reendothelialisierung untersuchen. Hierzu wurden die Auswirkungen der gesteigerten DNA- Replikation (Mitogenese) auf die tatsächliche Zellzahl untersucht. Gerade die Wachstumssteigerung der EC und nicht der gesteigerte Energieumsatz würde die in-vivo vermehrt zu beobachtenden Reendothelialisierung der luminalen Oberfläche [LaMuraglia et al., 1994] widerspiegeln.

Tatsächlich wurde die Proliferation in den Versuchen der vorliegenden Arbeit der EC auf PDT-behandelter ECM signifikant und in allen untersuchten Zeitpunkten gegenüber den EC auf unbehandelter ECM gesteigert. Da sich die Zellen wie EC in matrixfreier Umgebung verhielten läßt das zunächst vermuten, daß die ECM durch die PDT-Behandlung zerstört oder möglicherweise bei den Präparationsschritten gewaschen wurde. Voruntersuchungen zeigten aber, unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen Fibronectin (ein Bestandteil der ECM), daß die ECM in den 6-Lochplatten nach PDT vorhanden ist [Adili et al., 1996].

Weiterhin könnte die vermehrte Proliferation der EC einzig durch die Bestrahlung des Lasers ausgelöst sein. Stimulierende Effekte durch Laserbestrahlung von Zellen sind bekannt [Calzavara et al., 1996]. Um eventuelle isolierte Effekte, die durch den Laser verursacht sein könnten, zu dokumentieren, wurde deshalb die Proliferation von EC auf ECM, die nur mit Laserlicht (ohne CASPc) bestrahlt wurde bestimmt. Es zeigte sich, daß das Licht alleine keine signifikanten Proliferationsänderungen der EC vermochte.

Auch wurde die Cytotoxizität des Farbstoffs CASPc geprüft, indem nur der Farbstoff auf die ECM gegeben wurde und anschließend keine Laserbestrahlung stattfand. Die EC die auf diese Matrix gegeben wurden, zeigten auch hier zu allen untersuchten Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den EC auf unbehandelter ECM.

Die PDT-behandelte ECM scheint also einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation der EC zu haben. Diese Feststellung läßt sich mit der in-vivo Situation in Einklang

bringen, die nach PDT mit einer akzelerierten Reendothelialisierung der Intima und dem Ausbleiben des Einwachsens von SMC einher geht [LaMuraglia et al., 1994].

Ein Erklärungsansatz für die gesteigerte Proliferation der EC nach PDT der ECM ist, daß die ECM und matrix-gebundene Wachstumsfaktoren, sowie -Inhibitoren durch Bestrahlung so moduliert werden, daß eine akzelerierte Reendothelialisierung resultiert. Durch vorangegangene Untersuchungen ist bekannt, daß in der ECM gebundene Wachstumsfaktoren, aber auch -inhibitoren, durch PDT signifikant vermindert werden. Ein spezielles Interesse im Zusammenhang mit EC gilt $\text{TGF}\beta_1$, einem multifunktionellen Cytokin, welches von Thrombozyten und lokalen Gefäßzellen produziert wird. $\text{TGF}\beta_1$ ist ein potenter Inhibitor für die Proliferation und Migration von EC. Die Freisetzung dieses Cytokins von anheftenden Thrombozyten und intimalen SMC im Bereich von Gefäßverletzungen kann die EC- Regeneration beeinflussen [Heimark et al., 1986]. PDT von matrixgebundenem $\text{TGF}\beta_1$ führt zur Stimulation der EC- Mitogenese [van Eps et al., 1997a]. Die Inaktivierung von Wachstumsinhibitoren durch PDT in der ECM (und damit in der Gefäßwand) könnte in einer erhöhten Genexpression von EC resultieren, damit die Reendothelialisierung begünstigen und IH durch die gefäßprotektiven Eigenschaften von EC inhibieren.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Hypothese, daß EC nach PDT der ECM möglicherweise in der Lage sind, zelleigene Wachstumsfaktoren vermehrt produzieren zu können. Dies wäre ein Erklärungsansatz dafür, wie sich die Reendothelialisierung nach PDT von Gefäßen ausgehend von der Intima umliegender unverletzter Gefäßabschnitte vollzieht. Einer der potentesten Wachstumsfaktoren für EC stellt bFGF dar. Würde dieser Wachstumsfaktor nach PDT vermehrt produziert, wäre die Stimulation der EC durch zelleigenes bFGF und eine folgende günstige Reendothelialisierung erklärbar. In dieser Arbeit wurde im Hinblick auf diese Überlegung die bFGF mRNA Expression in EC nach Bestrahlung der ECM beispielhaft für andere Wachstumsfaktoren untersucht.

4.2.2 Bestimmung der bFGF mRNA Expression von Endothelzellen nach Photodynamischer Therapie von extrazellulärer Matrix

Eine Reihe von Untersuchungen haben den modulierenden Einfluß auf Reendothelialisierungsprozesse von endothelialen Wachstumsfaktoren zeigen können. Die Fähigkeit bestimmter Cytokine als Mitogen für EC in vitro zu wirken, läßt vermuten, daß diese wachstumsstimulierenden Moleküle für die akzelerierte Reendothelialisierung nach Ballonverletzung oder Plaqueruptur verantwortlich sein könnten [Asahara et al., 1995]. Die systemische Gabe von bFGF induziert eine hoch signifikante Zunahme der Replikationsrate und führt damit zum beschleunigten Einwachsen von EC im Tierexperiment [Lindner et al., 1990].

EC synthetisieren bFGF, sezernieren es jedoch unter normalen Bedingungen nicht, oder in nur geringem Maße [Vlodavsky et al., 1987]. Werden die EC jedoch verletzt, kommt es zur Freisetzung und parakrinen Stimulation der benachbarten SMC [Gajdusek et al., 1989]. Befinden sich die EC in einem Zustand erhöhter proliferativer und migratorischer Aktivität, so liegt dem häufig ein erhöhter intrazellulärer bFGF-Level und eine autokrine Stimulation zugrunde [Arese et al., 1999; Dinbergs et al., 1996; Tsuboi et al., 1990]. Aus der Angiogene-Forschung im Zusammenhang mit Tumervaskularisation ist darüber hinaus bekannt, daß im Rahmen erhöhter Aktivität während Angioproliferation, EC dazu stimuliert werden ihre Expression von bFGF autokrin heraufzuregeln [Haimovitz-Friedman et al., 1991; Gualandris et al., 1996].

Die EC zeigen in der vorliegenden Arbeit einen signifikanten Anstieg der bFGF mRNA Expression auf PDT-behandelter Matrix nach 24 Stunden, wobei die Proliferation der EC bis zu 72 Stunden anhaltend erhöht war. Auch die EC auf 6-Wellen ohne ECM demonstrierten diese Änderung der bFGF mRNA Expression zu diesem Zeitpunkt. Die Ursache für eine Dissoziation der Kinetik von bFGF mRNA Expression einerseits und Proliferationsverhalten andererseits, ist unklar. Mehrere Erklärungsmöglichkeiten bieten sich jedoch an:

Es ist bekannt, daß lediglich das niedermolekulare, zytoplasmatische bFGF (18 kDa) für die autokrine Stimulation verantwortlich ist. Unter sog. *low serum*-Bedingungen, d.h. bei einer erniedrigten FCS-Konzentration im Zellkulturmedium, wie z.B. 0,5% während der hier vorliegenden bFGF Expressionsuntersuchungen, kommt es zu einer selektiven Überexpression der hochmolekularen, nuklearen bFGF Isoformen mit der Folge einer

intrakrinen bzw. nuklearen Stimulation des Wachstums [Arese et al., 1999]. Dabei spielt das niedermolekulare bFGF lediglich die Funktion eines biologischen Botenstoffes für den autokrinen und letztlich intrakrinen Wachstumsstimulus durch das hochmolekulare bFGF [Arese et al., 1999]. Da in den eigenen Untersuchungen lediglich die bFGF mRNA Expression der niedermolekularen Form erfasst worden ist, konnte auch nur die autokrine Komponente erfasst werden, jedoch nicht eine intrakrine bzw. nukleare Stimulation, die möglicherweise zeitversetzt begonnen hat und charakteristischerweise für Zellproliferation unter *low serum*-Bedingungen verantwortlich ist.

Eine weitere Hypothese basiert auf der Abwesenheit des bereits für dieses Model als relevanter Inhibitor identifizierte TGF- β_1 in der PDT-behandelten ECM bzw. im ECM-freien Well (PL). Vorangegangene Arbeiten zeigten, daß PDT der ECM und der Zellen wichtige Wachstumsfaktoren, aber auch Wachstumsinhibitoren der Umgebung bzw. der Zellen vermindern bzw. eliminieren [van Eps et al., 1997; LaMuraglia et al., 1997]. Die EC scheinen sich demnach zunächst in einem mitogenfreien Umfeld zu befinden. Eine anschließende Steigerung von intrazellulärem bFGF und die Freisetzung von bFGF in das Umfeld der EC könnte so über autokrine Stimulation stattfinden. Die zusätzliche extrazelluläre Verminderung von Wachstumsinhibitoren, wie es für TGF β_1 bereits gezeigt wurde [van Eps et al., 1997], könnte diesen Prozeß unterstützen. EC auf Zellkulturplastik ohne ECM verhielten sich im Bezug zur bFGF mRNA Expression fast identisch und hatten ein mitogenfreies Umfeld. Dies läßt vermuten, daß PDT von ECM die Umgebung von EC so verändert, daß EC bFGF mRNA vermehrt exprimieren und diese Veränderungen für eine gesteigerte Proliferation der EC verantwortlich sind. Ein Aspekt, der diese Hypothese besonders stützt liegt begründet in der Tatsache, daß matrixgebundenes, d.h. an Heparansulfate gebundenes bFGF in der unmittelbaren Umgebung der Zellen eine stärkere biologische Wirksamkeit hat und auch gleichmäßiger wieder freigesetzt wird als direkt ins Medium abgegebenes bFGF [Dinbergs et al., 1996]. Die biologische Funktion von bFGF wird hierbei durch die Interaktion des *high- und low-affinity* Plasmamembranrezeptors vermittelt [Baird et al., 1994]. Der *low-affinity* Rezeptor besteht aus Heparansulfat- Proteoglykanen, die sich auf der Zelloberfläche und in der umgebenden ECM befinden. Es wird angenommen, daß die mitogene Wirkung von bFGF erst dann zustande kommt, nachdem bFGF durch diesen Rezeptor dem *high-affinity* Rezeptor präsentiert worden ist [Baird et al., 1994]. Voruntersuchungen zeigten, das PDT der ECM zu einer Inaktivierung von bFGF führen ohne die funktionelle Integrität des matrixresistenten *low-affinity* bFGF Rezeptors

(Heparansulfat) zu beeinflussen [LaMuraglia et al., 1997]. Die exogene Zufuhr von bFGF auf PDT- behandelte Matrix resultierte in einer Wiederherstellung der Zellproliferation zu einem Maß vergleichbar mit normaler, unbehandelter ECM [LaMuraglia et al., 1997]. Würde also die fortwährende Anregung der Proliferation auf einer persistierenden, autokrinen bFGF Stimulation basieren, so müsste letztlich die Proliferationssteigerung bei PDT länger anhalten bzw. stärker ausfallen als die bei EC auf 6-Wellen ohne ECM. Dies war in der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht der Fall. Diese Frage könnte lediglich ein Zusatzexperiment unter Verwendung eines neutralisierenden bFGF-Antikörper beantworten. Das Ausmaß der durch diesen Antikörper verursachten Proliferationshemmung könnte Aufschluß auf den zugrundeliegenden Hauptmechanismus der Proliferationssteigerung geben. Ähnliche Experimente waren zuvor mit dem TGF- β_1 durchgeführt worden und belegten die funktionelle Relevanz dieses Cytokins [van Eps et al., 1997].

Da stimulierende Effekte durch Laserbestrahlung von Zellen bekannt sind und sogar vor allem im Bereich der Dermatologie zu therapeutischen Zwecken genutzt werden [Calzavara-Pinton et al., 1996], wurde, um eventuelle isolierte Effekte des Lasers zu dokumentieren, die bFGF mRNA Expression von EC nach 24 Stunden Wachstum auf ECM, die nur mit Laserlicht bestrahlt wurde bestimmt. In EC die auf ECM, die nur dem Laserlicht ausgesetzt war, konnte keine signifikant erhöhte bFGF mRNA Expression gegenüber den EC auf unbehandelter ECM dokumentiert werden. Eine signifikante Veränderung der bFGF Synthese ist demnach nicht isolierten Lasereffekten zuzuschreiben und nur durch die Kombination von Farbstoff und Laser zu erreichen.

Weiterhin wurden die Auswirkungen des Photosensitizers auf die Zellen untersucht. Die bFGF mRNA Expression in EC auf ECM, die nur dem Photosensitizer ausgesetzt wurde, zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich mit den EC auf unbehandelter ECM zu diesem Zeitpunkt. Ein Indiz dafür, daß CASPc auf EC ohne adäquate Licht-Aktivierung keinen biologischen Effekt hat.

4.3 Bedeutung von bFGF für SMC Funktionen nach PDT von ECM

4.3.1 Bestimmung der Proliferation von glatten Muskelzellen nach Photodynamischer Therapie von extrazellulärer Matrix

Glatte Muskelzellen spielen für die Entwicklung der IH eine fundamentale Rolle. Dabei bestimmt das Ausmaß der Proliferation zu einem großen Teil das Maß der resultierenden Gefäßeinengung [Davies et al., 1994]. Die Proliferation von SMC wird hierbei durch die Eigenschaften der ECM beeinflusst.

Bisherige in-vitro Untersuchungen studierten den PDT-induzierten ECM-Effekt auf SMC nur nach 24 Stunden und zeigten eine Mitosehemmung von SMC [Adili et al., 1996]. Eine autokrine Stimulation kann damit nicht ausgeschlossen werden, da diese auch zu einem späteren Zeitpunkt einsetzen kann. Auch untersuchten die bisherigen Studien nicht die reinen Zellzahlen, wie dies in dieser Arbeit durchgeführt wurde, sondern den Einbau von ^3H -Thymidin in die Zellen, welcher auf den Energieumsatz der Zelle schließen läßt, nicht aber auf die Anzahl der Zellen. Zum ersten Mal wurde der PDT-Effekt von ECM auf die Anzahl der SMC und deren zeitlichen Entwicklung betrachtet und zeigte eine über 72 Stunden anhaltende signifikante Hemmung des Wachstums im Vergleich zu den SMC auf unbehandelter ECM.

Bekannt ist, daß die durch EC produzierte ECM nicht nur die Hauptbestandteile Kollagen (Typ IV), Glykoproteinen (Laminin, Fibronectin, Entaktin) und sauren Proteoglykanen (Heparansulfat) enthält [Vlodasky et al., 1987], sondern Hormone wie Prostaglandine, Wachstumsfaktoren wie bFGF und TGF- β und Inhibitoren wie NO. Diese werden durch PDT zumindest teilweise entfernt oder verändert [van Eps et al., 1997a]. Auf SMC wirkt sich die PDT-induzierte Modulation der ECM und ihrer Bestandteile nach den Daten dieser Arbeit als Wachstumshemmung aus.

Aus toten und zerstörten Zellen können große Mengen an Wachstumsfaktoren freigesetzt werden [Lindner et al., 1991]. Diese Wachstumsfaktoren können auf umliegende Zellen proliferationsfördernd wirken und inflammatorische Reaktionen auslösen. Eine durch PDT (mit $100\text{J}/\text{cm}^3$) induzierte Zelleradikation könnte somit ungewollte folgende restenotische Prozesse (erneute Proliferation von Zellen) auslösen. Eine Studie zeigte aber, daß PDT in der Lage ist, den Zelltod durch Apoptose auszulösen [Noodt et al., 1999]. Weiterhin zeigten in vivo Studien, daß der Einfluß der

bestrahlten ECM zusammen mit der direkten cytotoxischen Wirkung einen anhaltend inhibierenden Effekt auf SMC hat [LaMuraglia et al., 1997].

Die Wachstumshemmung von SMC könnte folgende Gründe haben: 1. Es wurde gezeigt, daß matrix-gebundenes bFGF signifikant durch PDT von ECM vermindert wird [van Eps et al., 1997c]. Da bFGF ein potenter Wachstumsfaktor für SMC ist, könnte die Verminderung dieses Proteins der ECM die Wachstumsinhibition erklären; 2. Matrix-gebundenes TGF β wird ebenfalls signifikant nach PDT von ECM vermindert [van Eps et al., 1997a]. Auch dieses Protein beeinflusst das Wachstum der SMC positiv, so daß die Verminderung von TGF β die Hemmung der SMC verursachen könnte.

Die Abnahme der SMC- Proliferation nach PDT-Vorbehandlung der Matrix legt den Schluss nahe, daß durch die Inaktivierung des matrix-assoziierten bFGF und des TGF β , bzw. weiterer matrix-assoziiierter Wachstumsfaktoren, bioaktive Stimuli für die SMC-Proliferation ausgeschaltet worden sind. Und dies in relevanterem Maße als die Ausschaltung potentiell ebenfalls vorhandener natürlich vorkommender Inhibitoren.

4.3.2 Bestimmung der bFGF mRNA Expression von glatten Muskelzellen nach Photodynamischer Therapie von extrazellulärer Matrix

Die SMC der PDT-behandelten ECM zeigten zu allen untersuchten Zeitpunkten keine signifikanten Veränderungen der bFGF mRNA Expression gegenüber der SMC auf unbehandelter ECM. Eine bisher unveröffentlichte Studie unserer Arbeitsgruppe konnte weiter zeigen, daß die intrazelluläre bFGF Proteinexpression, trotz der gezeigten unveränderten bFGF mRNA Expression, gesteigert ist. Unter Berücksichtigung der deutlich erniedrigten Proliferationsrate im Vergleich zu SMC auf unbehandelter ECM läßt dies vermuten, daß bFGF nicht, oder nur in wesentlich geringerem Maße als bei SMC auf unbehandelter ECM, aus der Zelle ausgeschleust werden konnte und eine autokrine Stimulation nur sehr limitiert stattfand. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse sprechen dennoch dafür, daß eine autokrine Stimulation der SMC auf PDT-behandelter ECM stattfand. Dies wird beim Vergleich mit SMC auf 6- Wells ohne ECM deutlich. Auf normalem Zellkulturplastik wurde nämlich eine signifikant erhöhte bFGF mRNA Produktion nachgewiesen, und das obwohl die Zellen noch weniger proliferierten als bei PDT. Unter den herrschenden Kulturbedingungen mit einer erniedrigten FCS-Menge im Serum, fand in der Gruppe PL tatsächlich keine

autokrine bFGF-Stimulation statt, obwohl die bFGF Synthese signifikant zugenommen hatte. Dieser Befund läßt sich nur dadurch erklären, daß vermehrt produziertes und in der Zelle befindliches bFGF die Zelle nicht verlassen und nicht biologisch aktiv werden konnte.

Da der genaue Mechanismus der bFGF-Ausschleusung nicht vollständig geklärt ist, bleibt letztlich schleierhaft, warum eine erhöhte intrazelluläre bFGF Protein-Konzentration bei gleichbleibender bFGF mRNA- Konzentration ohne Proliferation bei SMC auf PDT-behandelter ECM und auf Zellkulturplastik vorlag. Denkbar wäre jedoch, daß durch die Armut an Mitogenen im umgebenden Medium, die Zellen in einem Hungerzustand waren und die unter diesen Bedingungen zur Verfügung stehende Energie in Form von ATP nicht ausreichte, um zumindest den bis dato einzig bekannten, ATP-abhängigen Exozytosemechanismus für bFGF suffizient in Gang zu setzen [Florkiewicz et al., 1995].

Da das bFGF seine mitogene Wirkung erst entfalten kann, nachdem es den *high-affinity* Tyrosinkinasurezeptoren präsentiert worden ist, und zwar als Komplex mit den Heparansulfaten (*low-affinity* Rezeptoren), die vor allen Dingen in der Matrix lokalisiert sind, wird klar warum SMC auf PDT-behandelter Matrix, zumindest tendenziell besser proliferieren und bFGF auch offensichtlich besser ausschleusen konnten als SMC ohne jegliche Matrix in der Umgebung. Daß PDT von ECM die Low-affinity Rezeptoren unangetastet läßt, zeigten vorausgegangene Studien. Dabei wurde zunächst matrix-assoziiertes bFGF durch PDT inaktiviert und anschließend die ursprünglich in der Matrix vorhandene bFGF-Menge ersetzt. Hierdurch konnte die Mitogenese der SMC auf das Ausgangsniveau zurückgeführt werden [LaMuraglia et al., 1997], was im Einklang mit in-vivo Studien steht, bei denen noch 6 Wochen nach Gefäßwandverletzung durch die intra-arterielle Infusion von bFGF eine Proliferationssteigerung von lumennahen, jedoch nicht medialen SMC erreichen lies [Lindner et al., 1991].

Mignatti und Mitarbeiter haben zeigen können, daß die bFGF-Konzentration in der unmittelbaren Umgebung der Zellen bestimmte Funktionen wie z.B. die Migration modulieren [Mignatti et al., 1992]. Dies bedeutet, daß bFGF, sobald es sezerniert worden ist, auf der Zelloberfläche oder in unmittelbarer Umgebung der Zelle (Matrix) konzentriert werden muß, um biologisch wirksam zu werden. Dies ist bei PDT-behandelter Matrix aufgrund der Präsenz der intakten Heparansulfate möglich, bei Zellkulturplastik jedoch nicht. Änderungen der bFGF-Konzentration in der

unmittelbaren Umgebung der Zellen durch Zugabe von exogenem bFGF, anti-bFGF, oder Alterationen bei der Freisetzung von endogenem bFGF wie bei PDT führen zu einer Stimulation oder Inhibition der Zellfunktionen [Mignatti et al., 1992]. Führt eine bestimmte Behandlung von Zellen zu einer erniedrigten Freisetzung von bFGF resultiert daraus letztlich funktionell ein Aktivitätsniveau, das vergleichbar ist mit der von Zellen, die durch eine erniedrigte Synthese von bFGF gekennzeichnet ist [Mignatti et al., 1992]. Dieser Zustand liegt möglicherweise den Ergebnissen der hier vorliegenden Untersuchung zugrunde.

4.3.3 Konsequenzen für die in-vivo Situation

In-vivo zeichnet sich PDT eines verletzten Gefäßes vor allem durch die vollständige Eradikation der SMC der Media bei akzelerierter Reendothelialisierung aus. Eine in-vitro Studie zeigte an einer Co-Kultur den Einfluß der Anwesenheit von EC auf das Wachstumsverhalten von SMC, die in ihrem Wachstum durch subkonfluente EC stimuliert wurden, aber durch konfluente EC in ihrem Wachstum inhibiert wurden [Lin et al., 1998]. Geht man nun davon aus, daß EC bFGF freisetzen und sich über autokrine Mechanismen nach PDT von ECM selbst stimulieren, bleibt die Frage, warum umliegende SMC in-vivo durch dieses von EC synthetisierte bFGF nicht auch angeregt werden und evtl. IH induzieren. Dies hat wahrscheinlich folgende Gründe: Erstens, es sind keine SMC in der Media nach PDT vorhanden, die überhaupt stimuliert werden könnten. Der Großteil der Zellen, die noch vorhanden sind, befinden sich in der Adventitia bzw. im angrenzenden, PDT-unbehandeltem Gewebe. Zweitens, ist die Strecke von der Intima in die Media bzw. Adventitia für Wachstumsfaktoren, die autokrin und somit lokal begrenzt wirken, da sie an Oberflächenrezeptoren der gleichen Zelle binden, so gut wie unüberwindbar [Mignatti et al., 1991]. Drittens, die zelluläre Repopularisierung der Media wird mit großer Wahrscheinlichkeit durch direkte Alteration der strukturellen Matrixproteine, wie z.B. Kollagen, in der ECM [Overhaus et al., 2000] und durch die Depletion der matrix-assoziierten Wachstumsfaktoren der SMC [LaMuraglia et al., 1997; Adili et al., 1996; van Eps et al., 1997] inhibiert.

Die bisher beobachteten PDT-Effekte durch Bestrahlung der ECM bzw. der Zellen wirken sich in-vivo am ehesten folgendermaßen aus: die SMC der Media werden initial eliminiert (Effekt durch direkte Bestrahlung der Zellen). Das (Ballon-) verletzte Endothelium der Intima wird akut durch autokrine Mechanismen der EC regeneriert, wobei zusätzlich Inhibitoren, wie $TGF\beta_1$, vermindert werden (durch Bestrahlung der ECM). SMC können die mitogene Wirkung autokriner Wachstumsfaktoren nicht entfalten, bleiben vermindert und wachsen nicht in die Intima ein (durch Bestrahlung der ECM). Die strukturelle Integrität des Gefäßes bleibt dabei erhalten. Die Kombination aus der Bestrahlung der Zellen und der Bestrahlung der ECM resultiert anscheinend in den in-vivo beobachteten günstigen PDT-Effekten, die sich additiv positiv auf die Hauptursachen der IH-Entwicklung (Einwachsen von SMC in die Intima mit dem Verlust des intakten Endothels) auswirken.

5 Zusammenfassung

Die Hauptkomplikation (bis zu 30-50%) bei der Therapie von Gefäßeinengungen (Stenosen) nach invasiven Interventionen ist eine durch Verletzung des Gefäßes verursachte erneute Einengung (Restenose) der Gefäßstrombahn. Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) gehört zu einer Gruppe von 21 strukturell miteinander verwandten Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren, die auf eine Vielzahl verschiedener biologischer Prozesse wie Zellproliferation, -migration, Plasminogenaktivierung, Integrinexpression sowie embryonale Entwicklung und Differenzierung wirken. Insbesondere innerhalb der ersten 72 Stunden nach Gefäßwandverletzungen ist es an der Proliferationssteigerung glatter Gefäßmuskelzellen (SMC) und damit an der Entwicklung von Intimahyperplasie (IH) und Gefäßstenosen durch autokrine und parakrine Stimulation beteiligt. Photodynamische Therapie (PDT) hemmt IH und bewirkt hierbei eine vollständige Gefäßzelleradikation mit minimaler Repopulation der Media bei beschleunigter Reendothelialisierung. Weiterhin wird matrix-assoziiertes bFGF inaktiviert und dadurch die Mitoserate und Migration von SMC inhibiert, von Endothelzellen (EC) jedoch gesteigert. Um festzustellen, welchen Einfluß bFGF auf das Remodeling nach Verletzung der Gefäßwand und erfolgter PDT hat, untersucht die vorliegende in-vitro Studie Proliferation sowie bFGF-mRNA-Expression boviner aortaler EC und SMC nach PDT von isolierter extrazellulärer Matrix (ECM).

Hierzu wurde ECM nach einer Standardtechnik in 6-Loch Zellkulturplatten hergestellt. Durch Bestrahlung des Farbstoffs Chloraluminium sulfoniertes Phthalocyanin (CASPc; 1 µg/ml) mit Licht (100 J/cm², 100 mW/cm², λ =675 nm) wurde die Matrix photodynamisch behandelt. Nach Besiedlung der Matrices mit 2×10^5 EC bzw. SMC wurde die Proliferation 24, 48 und 72h durchflußzytometrisch bestimmt. Um die quantitative Bestimmung der bFGF mRNA Expression 12, 24 und 48h nach PDT zu realisieren, wurden erstmals die PCR-Bedingungen für β -Actin und bFGF der EC und SMC auf das LightCycler™-System abgestimmt und etabliert.

Die Proliferation von EC nach PDT wurde zu allen Zeitpunkten gegenüber EC auf unbehandelter ECM signifikant ($p < 0,0004$) stimuliert, die von SMC hingegen signifikant ($p < 0,002$) gehemmt. Die bFGF mRNA-Expression in EC nach PDT der ECM zeigte gegenüber EC auf unbehandelter ECM lediglich einen signifikanten ($p <$

0,005) Anstieg nach 24h. In SMC nach PDT der ECM konnten hingegen keine signifikanten Änderungen dokumentiert werden.

Die Ergebnisse dieser Studie, legen den Schluß nahe, daß es durch einen PDT-Effekt der ECM zu einer akzelerierten Reendothelialisierung kommt. Die anhaltend verstärkte Proliferation der EC ist dennoch wahrscheinlich nicht allein dem vergleichbar kurzen Anstieg der bFGF mRNA-Expression zuzuschreiben.

Die Abnahme der SMC-Proliferation nach PDT-Vorbehandlung der ECM läßt vermuten, daß bioaktive Stimuli für die Zellvermehrung ausgeschaltet worden sind. Da hier jedoch eine erhöhte bFGF Protein Konzentration (dies zeigte eine unveröffentlichte Studie unserer Arbeitsgruppe) ohne erhöhte bFGF mRNA Expression vorlag, läßt dies nur den Schluß zu, daß bFGF nicht oder nur in geringem Maße aus den SMC ausgeschleust werden konnte und es zu einer Hemmung der bFGF-vermittelten autokrinen Stimulation der SMC in diesem Modell kommt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die unterschiedliche intrazelluläre Beeinflußung der Gefäßzellfunktionen von EC und SMC durch PDT von ECM und eröffnen damit nicht nur weitere Aspekte zur Aufklärung der Mechanismen der vaskulären PDT, sondern könnten auch zum Verständnis verschiedener Interaktionen zwischen Zellen und deren unmittelbaren Umfeld beitragen.

6 Summary

The development of restenosis (up to 30-50%) caused by injury after invasive vascular interventions remains a significant clinical problem. Basic fibroblast growth factor (bFGF) plays an important role for the proliferation of vascular smooth muscle cells (SMC) and the development of intimal hyperplasia, particularly within the first 72 hours following injury. Photodynamic therapy (PDT) is a technique to inhibit intimal hyperplasia (IH), being able to deplete vascular cells throughout all layers of the vascular wall with a lack of repopulation of the media and accelerated reendothelialization of the intima. Furthermore, matrix-associated bFGF is inactivated by PDT, mediating decreased mitosis and migration of smooth muscle cells (SMC) but increased mitosis and migration of endothelial cells (EC). This *in vitro* study was designed to determine proliferation, as well as bFGF-mRNA expression in bovine EC and SMC seeded on PDT-treated extracellular matrix (ECM) to elucidate the role of bFGF for the remodeling process following PDT.

Endothelial cell-derived ECM was isolated in 6-well plates using a standard technique. Following 2h incubation with the photosensitizer chloroaluminum sulfonated phthalocyanine (CASPc; 1µg/ml) and irradiation with laser light emitted by a diode laser (fluence 100 J/cm²; irradiance 100 mW/cm²; λ=675nm) EC respectively SMC were seeded at a density of 2x10⁵ cells/well. Proliferation was assessed by fluorescence cell counting at 24, 48, and 72h. bFGF mRNA-expression was determined by establishing a quantitative PCR for β-Actin and bFGF on the LightCycler™-System at 12, 24 and 48h respectively after PDT.

EC proliferation on PDT matrix was significantly increased at all time intervals as compared to normal matrix ($p < 0,0004$), whereas SMC proliferation was significantly inhibited ($p < 0,002$). bFGF mRNA-expression of EC following PDT of ECM was increased versus KO at 24h only ($p < 0,005$), whereas no changes were noted in PDT at all time points.

The present data suggest that PDT-effects of ECM accelerated reendothelialisation. Although expression of bFGF-mRNA with autocrine stimulation of EC proliferation was initiated, this mechanism may not solely be responsible for a constant stimulation of EC proliferation following PDT.

The inhibition of SMC proliferation after PDT of ECM suggests that bioactive stimuli for the cell reproduction were eliminated. Unchanged bFGF-mRNA expression in

conjunction with temporarily increased intracellular protein expression (unpublished data) suggests a decreased release of bFGF with subsequent inhibition of autocrine stimulation.

However, the data of this study demonstrate altered vascular cell functions caused by PDT-induced changes in the ECM and opens a new line of investigation that may not only provide further insights into the mechanism of vascular PDT, but may also help to gain a better understanding of the various interactions between the cells and their immediate environment in vascular remodeling.

7 Literaturverzeichnis

1. Abraham JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman J, Hjerrild KA, Gospodarowicz D, Fiddes JC.:
Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor.
Science. 1986;233:545-548.
2. Adili F, Karp SJ, Chang M, van Eps RGS, Watkins MT, LaMuraglia GM.:
Photodynamic therapy alters extracellular matrix: differential modulation of vascular cell function.
Surg Forum. 1995;46:358-360.
3. Adili F, van Eps RGS, Karp SJ, Watkins MT, LaMuraglia GM.:
Differential modulation of vascular endothelial and smooth muscle cell function by photodynamic therapy of extracellular matrix: novel insights into radical-mediated prevention of intimal hyperplasia.
J Vasc Surg. 1996;23:698-705.
4. Aktas G and Kayton R.:
Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor in fibroblasts and extracellular matrix.
Histochem Cell Biol. 2000;113:227-233.
5. Arnaud E, Touriol C, Boutonnet C, Gensac MC, Vagner S, Prats H, Prats AC.:
A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor.
Mol Cell Biol. 1999;19:505-514.
6. Arese M, Chen Y, Florkiewicz RZ, Gualandris A, Shen B, Rifkin DB.:
Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals.
Mol Biol Cell. 1999;10:1429-1444.
7. Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM.:
Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery.
Circulation. 1995;91:2793-2801.
8. Asselin E, Drolet P, Fortier MA.:
Cellular mechanisms involved during oxytocin-induced prostaglandin F₂α production in endometrial epithelial cells in vitro: role of cyclooxygenase-2.
Endocrinology. 1997;138:4798-4805.

9. Bai H, Masuda J, Sawa Y, Nakano S, Shirakura R, Shimazaki Y, Ogata J, Matsuda H.:
Neointima formation after vascular stent implantation. Spatial and chronological distribution of smooth muscle cell proliferation and phenotypic modulation.
Arterioscler Thromb. 1994;14:1846-1853.
10. Baird A.:
Potential mechanisms regulating the extracellular activities of basic fibroblast growth factor (FGF-2).
Mol Reprod Dev. 1994;39:43-48.
11. Blum HF.:
Photodynamic action and diseases caused by light.
New York: *Reinhold*, 1941. Reprinted. New York: *Hafner*, 1964.
12. Boulnois J.:
Photophysical process in recent medical laser development: A Review.
Lasers Med Sci. 1986;1:47-66.
13. Bown SG, Tralau CJ, Smith PD, Akdemir D, Wieman TJ.:
Photodynamic therapy with porphyrin and phthalocyanine sensitisation: quantitative studies in normal rat liver.
Br J Cancer. 1986;54:43-52.
14. Bugler B, Amalric F, Prats H.:
Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor.
Mol Cell Biol. 1991;11:573-577.
15. Calzavara-Pinton PG, Szeimies RM, Ortel B, Zane C.:
Photodynamic therapy with systemic administration of photosensitizers in dermatology.
Photochem Photobiol. 1996;36:225-231.
16. Carrel A, Guthrie CC.:
Anastomosis of blood vessels by the patching method and transplantation of the kidney.
JAMA. 1906;47:1648-1650.
17. Chervu A, Moore WS.:
An overview of intimal hyperplasia.
Surg Gynecol Obstet. 1990;171:433-437.
18. Clowes AW, Clowes MM, Au YP, Reidy MA, Berlin D.:
Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue-type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery.
Circ Res. 1990;67:61-67.
19. Clowes AW, Clowes MM, Fingerle J, Reidy MA.:
Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery.
J Cardiovasc Pharmacol. 1989;14(Suppl 6):S12-15.

20. Clowes AW, Clowes MM, Fingerle J, Reidy MA.:
Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. V. Role of acute distension in the induction of smooth muscle cell proliferation.
Lab Invest. 1989;60:360-364.
21. Clowes AW, Clowes MM, Kocher O, Ropraz P, Chaponnier C, Gabbiani G.:
Arterial smooth muscle cells in vivo: relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin.
J Cell Biol. 1988;107:1939-1945.
22. Clowes AW, Clowes MM.:
Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. II. Inhibition of smooth muscle cell growth by heparin.
Lab Invest. 1985;52:611-616.
23. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM.:
Mechanisms of stenosis after arterial injury.
Lab Invest. 1983;49:208-215.
24. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM.:
Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium.
Lab Invest. 1983;49:327-333.
25. Clowes AW, Reidy MA.:
Prevention of stenosis after vascular reconstruction: Pharmacologic control of intimal hyperplasia-A review.
J Vasc Surg. 1991;13:885-891.
26. Clowes AW, Schwartz SM.:
Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery.
Circ Res. 1985;56:139-45.
27. Connolly DT, Stoddard BL, Harakas NK, Feder J.:
Human fibroblast-derived growth factor is a mitogen and chemoattractant for endothelial cells.
Biochem Biophys Res Commun. 1987;144:705-712.
28. Constantinescu DE, Banka VS, Tulenko TN.:
Lovastatin inhibits proliferation of arterial smooth muscle and endothelial cells. Indication in atherosclerosis and prevention of restenosis.
Eur Heart J. 1992;13(Suppl):82(Abstact).
29. Cordon-Cardo C, Vlodavsky I, Haimovitz-Friedman A, Hicklin D, Fuks Z.:
Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues.
Lab Invest. 1990;63:832-840.
30. Davies MG, Hagen PO.:
Pathobiology of intimal hyperplasia.
BR J Surg. 1994;81:1254-1269.

31. Di Blasio AM, Vigano P, Cremonesi L, Carniti C, Ferrari M, Ferrari A.:
Expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and its receptor in
human granulosa cells.
Mol Cell Endocrinol. 1993;96:R7-11.
32. Dinbergs ID, Brown L, Edelman ER.:
Cellular response to transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth
factor depends on release kinetics and extracellular matrix interactions.
J Biol Chem. 1996;271:29822-29829.
33. Douek PC, Correa R, Neville R, Unger EF, Shou M, Banai S, Ferrans VJ, Epstein
SE, Leon MB, Bonner RF.:
Dose-dependent smooth muscle cell proliferation induced by thermal injury with
pulsed infrared lasers.
Circulation. 1992;86:1249-1256.
34. Dougherty TJ.:
A brief history of clinical photodynamic therapy development at Roswell Park
Cancer Institut.
J Clin Laser Med. 1996;14:219-221.
35. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J,
Peng Q.:
Photodynamic therapy.
J Natl Cancer Inst. 1998;90:889-905.
36. Edelmann ER, Nuget MA, Karnovsky MJ.:
Perivascular and intravenous administration of basic fibroblast growth factor:
vascular and solid organ deposition.
Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:1513-1517.
37. Edelmann ER, Nuget MA, Smith LT, Karnovsky MJ.:
Basic fibroblast growth factor enhances the coupling of intimal hyperplasia and
proliferation of vasa vasorum in injured rat arteries.
J Clin Invest. 1992;89:465-473.
38. Emanuelsson H, Beatt KJ, Bagger JP, Balcon R, Heikkila J, Piessens J, Schaeffer
M, Suryapranata H, Foegh M.:
Long-term effects of angiopeptin treatment in coronary angioplasty. Reduction of
clinical events but not angiographic restenosis.
Circulation. 1995;91:1689-1696.
39. Engleka KA, Maciag T.:
Inactivation of human fibroblast growth factor-1 (FGF-1) activity by interaction
with copper ions involves FGF-1 dimer formation induced by copper-catalyzed
oxidation.
J Biol Chem. 1992;267:11307-11315.
40. Eton D, Shim V, Maibenco TA, Spero K, Cava RA, Borhani M, Grossweiner L,
Ahn SS.:
Cytotoxic effect of photodynamic therapy with Photofrin II on intimal hyperplasia.
Ann Vasc Surg. 1996;10:273-282.

41. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R.:
Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF.
Science. 1991;253:1129-1132.
42. Fingerle J, Au YP, Clowes AW, Reidy MA.:
Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury.
Arteriosclerosis. 1990;10:1082-1087.
43. Florkiewicz RZ, Majack RA, Buechler RD, Florkiewicz E.:
Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway.
J Cell Physiol. 1995;162:388-399.
44. Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I.:
A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane.
Am J Pathol. 1988;130:393-400.
45. Foote CS.:
Mechanisms of photooxygenation.
Prog Clin Biol Res. 1984;170:3-18.
46. Fridman R, Alon Y, Doljanski F, Fuks Z, Vlodavsky I.:
Cell interaction with the extracellular matrices produced by endothelial cells and fibroblasts.
Exp Cell Res. 1985;158:461-476.
47. Gajdusek CM, Carbon S.:
Injury-induced release of basic fibroblast growth factor from bovine aortic endothelium.
J Cell Physiol. 1989;139:570-579.
48. Galzie Z, Kinsella AR, Smith JA.
Fibroblast growth factors and their receptors.
Biochem Cell Biol. 1997;75:669-685.
49. Geary RL, Nikkari ST, Wagner WD, Williams JK, Adams MR, Dean RH.:
Wound healing: a paradigm for lumen narrowing after arterial reconstruction.
J Vasc Surg. 1998;27:96-106.
50. Gellman J, Ezekowitz MD, Sarembock IJ.:
Effect of lovastatin on intimal hyperplasia after balloon angioplasty: a study in an atherosclerotic hypercholesterolemic rabbit.
J Am Coll Cardiol. 1991;17:251-259.
51. Gerwins P, Skoldenberg E, Claesson-Welsh L.:
Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis.
Crit Rev Oncol Hematol. 2000;34:185-194.

52. Girotti AW.:
Photodynamic lipid peroxidation in biological systems.
Photochem Photobiol. 1990;51:497-509.
53. Gospodarowicz D, Vlodavsky I, Savion N:
The extracellular matrix and the control of proliferation of vascular endothelial and vascular smooth muscle cells.
J Supramol Struct. 1980;13:339-372.
54. Gravanis MB, Roubin GS.:
Histopathologic phenomena at the site of percutaneous transluminal coronary angioplasty: the problem of restenosis.
Hum Pathol. 1989;20:477-485.
55. Grondin CM, Meere C, Castonguay Y, Lepage G, Grondin P.:
Progressive and late obstruction of an aorto-coronary venous bypass graft.
Circulation. 1971;43:698-702.
56. Groves HM, Kinlough-Rathbone RL, Richardson M, Moore S, Mustard JF.:
Platelet interaction with damaged rabbit aorta.
Lab Invest. 1979;40:194-200.
57. Grunwald J, Haudenschild CC.:
Intimal injury in vivo activates vascular smooth muscle cell migration and explant outgrowth in vitro.
Arteriosclerosis. 1984;4:183-188.
58. Gualandris A, Rusnati M, Belleri M, Nelli EE, Bastaki M, Molinari-Tosatti MP, Bonardi F, Parolini S, Albini A, Morbidelli L, Ziche M, Corallini A, Possati L, Vacca A, Ribatti D, Presta M.:
Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases.
Cell Growth Differ. 1996;7:147-160.
59. Haimovitz-Friedman A, Vlodavsky I, Chaudhuri A, Witte L, Fuks Z.:
Autocrine effects of fibroblast growth factor in repair of radiation damage in endothelial cells.
Cancer Res. 1991;51:2552-2558.
60. Hamon M, Vallet B, Bauters C.:
Longterm oral administration of l-arginine reduces intimal thickening and enhances neoendothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation after arterial injury.
Circulation. 1994;90:1357-1362.
61. Hanke H, Strohschneider T, Oberhoff M, Betz E, Karsch KR.:
Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty.
Circ Res. 1990;67:651-659.
62. Heckenkamp J, Leszczynski D, Schiereck J, Kung J, LaMuraglia GM.:
Different effects of photodynamic therapy and gamma-irradiation on vascular

- smooth muscle cells and matrix : implications for inhibiting restenosis.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19:2154-2161.
63. Heimark RL, Twardzik DR, Schwartz SM.:
Inhibition of endothelial regeneration by type-beta transforming growth factor from platelets.
Science. 1986;233:1078-1080.
64. Henderson BW, Dougherty TJ.:
How does photodynamic therapy work?
Photochem Photobiol. 1992;55:145-157.
65. Indolfi C, Esposito G, Di Lorenzo E, Rapacciuolo A, Feliciello A, Porcellini A, Avvedimento VE, Condorelli M, Chiariello M.:
Smooth muscle cell proliferation is proportional to the degree of balloon injury in a rat model of angioplasty.
Circulation. 1995;92:1230-1235.
66. Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH.:
Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation.
J Am Coll Cardiol. 1990;15:1667-1687.
67. Jenkins MP, Buonaccorsi GA, Raphael M, Nyamekye I, McEwan JR, Bown SG, Bishop CC.:
Clinical study of adjuvant photodynamic therapy to reduce restenosis following femoral angioplasty.
Br J Surg. 1999;86:1258-1263.
68. Korner G, Bjornsson TD, Vlodavsky I.:
Extracellular matrix produced by cultured corneal and aortic endothelial cells contains active tissue-type and urokinase-type plasminogen activators.
J Cell Physiol. 1993;154:456-465.
69. Koshida K, Hisazumi H, Komatsu K, Hirata A, Uchibayashi T.:
Possible advantages of aluminum-chloro-tetrasulfonated phthalocyanine over hematoporphyrin derivative as a photosensitizer in photodynamic therapy.
Urol Res. 1993;21:283-288.
70. Koyama N, Harada K, Yamamoto A, Morisaki N, Saito Y, Yoshida S.:
Purification and characterisation of an autocrine migration factor for vascular smooth muscle cells (SMC), SMC-derived migration factor (SDMF).
J Biol Chem. 1993;268:13301-13308.
71. LaMuraglia GM, Adili F, Schmitz-Rixen T, Michaud NA, Flotte TJ.:
Photodynamic therapy inhibits experimental allograft rejection: A novel approach for the development of vascular bioprostheses.
Circulation. 1995;92:1919-1926.

-
72. LaMuraglia GM, Adili F, Karp SJ, van Eps RGS, Watkins MT.:
Photodynamic therapy inactivates extracellular matrix-basic fibroblast growth factor: Insights to its effect on the vascular wall.
J Vasc Surg. 1997;26:294-301.
 73. LaMuraglia GM, Chandrasekar ND, Flotte TJ, Abbott WK, Michaud D, Hasan T.:
Photodynamic therapy inhibition of experimental intimal hyperplasia: Acute and chronic effects.
J Vasc Surg. 1994;19:321-331.
 74. LaMuraglia GM, Klyachkin ML, Adili F, Abbot WM.:
Photodynamic therapy of vein grafts: suppression of intimal hyperplasia of vein graft but not the anastomosis.
J Vasc Surg. 1995;21:882-890.
 75. LaMuraglia GM, Ortu P, Flotte TJ, Roberts G, Schomacker KT, Chanrasekar ND, Hasan T.:
Chloraluminium sulfonated phthalocyanin partitioning in normal and intimal hyperplastic artery in the rat: Implications for photodynamic therapy.
Am J Pathol. 1993;142:1898-1905.
 76. LaMuraglia GM, Schiereck J, Heckenkamp J, Nigri G, Waterman P, Leszczynski D, Kossodo S:
Photodynamic therapy induces apoptosis in intimal hyperplastic arteries.
Am J Pathol. 2000;157:867-75.
 77. Leclerc G, Gal D, Takeshita S, Nikol S, Weir L, Isner JM.:
Percutaneous arterial gene transfer in a rabbit model. Efficiency in normal and balloon-dilated atherosclerotic arteries.
J Clin Invest. 1992;90:936-944.
 78. Lee SW, Trapnell BC, Rade JJ, Virmani R, Dichek DA.:
In vivo adenoviral vector-mediated gene transfer into balloon-injured rat carotid arteries.
Circ Res. 1993;73:797-807.
 79. Leon MB, Teirstein PS, Moses JW, Tripuraneni P, Lansky AJ, Jani S, Wong SC, Fish D, Ellis S, Holmes DR, Kerieakes D, Kuntz RE.:
Localized intracoronary gamma-radiation therapy to inhibit the recurrence of restenosis after stenting.
N Engl J Med 2001 Jan 25;344(4):250-6.
 80. Lin PH, Ren D, Hirko MK, Kang SS, Pierce GF, Greisler HP.:
Fibroblast growth factor-2-toxin induced cytotoxicity: differential sensitivity of co-cultured vascular smooth muscle cells and endothelial cells.
Atherosclerosis. 1998;137:277-289.
 81. Lindner V, Lappi D, Baird A, Majack RA, Reidy MA.:
Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation.
Circ Res. 1991;68:106-113.

82. Lindner V, Majack RA, Reidy MA.:
Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries.
J Clin Invest. 1990;85:2004-2008.
83. Lindner V, Reidy MA.:
Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor.
Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88:3739-3743.
84. Liu W, Roubin GS, Robinson KA.:
Trapidil in preventing restenosis after coronary angioplasty in atherosclerotic rabbit.
Circulation. 1990;81:1089-1093.
85. Lupu C, Poulsen E, Roquefeuil S, Westmuckett AD, Kakkar VV, Lupu F.:
Cellular effects of heparin on the production and release of tissue factor pathway inhibitor in human endothelial cells in culture.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19:2251-2262.
86. MARCATOR study group.:
Effect of high dose angiotensin-converting enzyme inhibition on restenosis: final results of MARCATOR study, a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of cilazapril
J Am Coll Cardiol. 1995;2:362-369.
87. Martyre MC, Le Bousse-Kerdiles MC, Romquin N, Chevillard S, Praloran V, Demory JL, Dupriez B.:
Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis.
Br J Haematol. 1997;97:441-448.
88. McBride W, Lange RA, Hillis LD.:
Restenosis after successful coronary angioplasty.
N Engl J Med. 1988;318:1734-1737.
89. MERCATOR study group.:
Does the new angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty? Results of the MERCATOR Study: a multicenter, randomised, double-blind, placebo-controlled trial.
Circulation. 1992;86:100-110.
90. Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB.:
Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex.
J Cell Physiol. 1992;151:81-93.
91. Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB.:
Basic fibroblast growth factor released by single, isolated cells stimulates their migration in an autocrine manner.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88:11007-11011.

92. Moan J, Berg K.:
The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen.
Photochem Photobiol. 1991;53:549-553.
93. Nabel EG, Yang ZY, Plautz G, Forough R, Zhan X, Haudenschild CC, Maciag T, Nabel GJ.:
Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo.
Nature 1993;362:844-846.
94. Nguyen HC, Steinberg BM, LeBoutillier M 3rd, Baumann FG, Rifkin DB, Grossi EA, Galloway AC.:
Suppression of neointimal lesions after vascular injury: a role for polyclonal anti-basic fibroblast growth factor antibody.
Surgery. 1994;116:456-462.
95. Noodt BB, Berg K, Stokke T, Peng Q, Nesland JM.:
Different apoptotic pathways are induced from various intracellular sites by tetraphenylporphyrins and light.
Br J Cancer. 1999;79:72-81.
96. Oleinick NL, Evans HH.:
The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms.
Radiat Res. 1998;150(5 Suppl):S146-156.
97. Ortu P, LaMuraglia GM, Roberts WG, Flotte TJ, Hasan T.:
Photodynamic therapy of arteries. A novel approach for treatment of experimental intimal hyperplasia.
Circulation. 1992;85:1189-1196.
98. Overhaus M, Heckenkamp J, Kossodo S, Leszczynski D, LaMuraglia GM.:
Photodynamic therapy generates a matrix barrier to invasive vascular cell migration.
Circ Res. 2000;86:334-340.
99. Pass IH.:
Photodynamic therapy in oncology: Mechanisms and clinical use.
J Natl Canc Inst. 1993;85:443-456.
100. Popma JJ, Califf RM, Topol EJ.:
Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty.
Circulation. 1991;84:1426-1436.
101. Randone B, Cucina A, Graziano P, Corvino V, Cavallaro G, Palmieri I, Cavallaro A, Sterpetti AV.:
Suppression of smooth muscle cell proliferation after experimental PTFE arterial grafting: a role for polyclonal anti-basic fibroblast growth factor (bFGF) antibody.
Eur J Vasc Endovasc Surg. 1998;16:401-407.

102. Reidy MA.:
Biology of disease. A reassessment of endothelial injury and arterial lesion formation.
Lab Invest. 1985;53:513-520.
103. Reidy MA, Fingerle J, Lindner V.:
Factors controlling the development of arterial lesions after injury.
Circulation. 1992. 86(6 Suppl):III43-III46.
104. Roberts WG, Klein MK, Loomis M, Weldy S, Berns MW.:
Photodynamic therapy of spontaneous cancers in felines, canines, and snakes with chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine.
J Natl Cancer Inst. 1991;83:18-23.
105. Rockson SG, Kramer P, Razavi M, Szuba A, Filardo S, Fitzgerald P, Cooke JP, Yousuf S, DeVault AR, Renschler MF, Adelman DC.:
Photoangioplasty for human peripheral atherosclerosis: results of a phase I trial of photodynamic therapy with motexafin lutetium (Antrin).
Circulation. 2000;102:2322-2324.
106. Rosenthal I.:
Phthalocyanines as photodynamic sensitizers.
Photochem Photobiol. 1991;53:859-870.
107. Schwartz RS, Topol EJ, Serruys PW, Sangiorgi G, Holmes DR Jr.:
Artery size, neointima, and remodeling: time for some standards.
J Am Coll Cardiol. 1998;32:2087-2094.
108. Scott NA, Cipolla GD, Ross CE.:
Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries.
Circulation 1996;93:2178-2187.
109. Sessler JL, Miller RA.:
Texaphyrins: new drugs with diverse clinical applications in radiation and photodynamic therapy.
Biochem Pharmacol. 2000;59:733-739.
110. Spikes JD:
Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors.
Photochem Photobiol. 1986;43:691-699.
111. Stouffer GA, Runge MS.:
The role of secondary growth factor production in thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells.
Semin Thromb Hemost. 1998;24:145-150.
112. Taylor PR, Wolfe JHN, Tyrrell MR, Mansfield AO, Nicolaides AN, Houston RE.:
Graft stenosis: justification for one -year surveillance.
Br J Surg. 1990;1125-1128.

113. Teirstein PS, Massullo V, Jani S.:
Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting.
N Engl J Med 1997;336:1697-1703.
114. Trauner KB, Hasan T.:
PDT treatment of rheumatoid and inflammatory arthritis.
Photochem Photobiol. 1996;64:740-750.
115. Tsuboi R, Sato Y, Rifkin DB.:
Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase
production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells.
J Cell Biol. 1990;110:511-517.
116. van Eps RGS and LaMuraglia GM.:
Photodynamic therapy inhibits transforming growth factor- β activity associated
with vascular smooth muscle cell injury.
J Vasc Surg. 1997b;25:1044-1053.
117. van Eps RGS, Adili F, LaMuraglia GM.:
Photodynamic therapy inactivates cell-associated basic fibroblast growth factor: a
silent way of vascular smooth muscle cell eradication.
Cardiovasc Res. 1997c;35:334-340.
118. van Eps RGS, Adili F, Watkins MT, Anderson RR, LaMuraglia GM.:
Photodynamic therapy of extracellular matrix stimulates endothelial cell growth by
inactivation of matrix-associated transforming growth factor- β .
Lab Invest. 1997a;76:257-266.
119. van Eps RGS, Mark L, Schiereck J, LaMuraglia GM.:
Photodynamic therapy inhibits the injury-induced fibrotic response of vascular
smooth muscle cells.
Eur J Endovasc Vasc Surg. 1999;18:417-423.
120. van Leeuwen WM, Deckers P, de Lange WJ.:
Preoperative irradiation for prophylaxis of ectopic ossification after hip athroplasty:
a randomized study in 62 hips.
Acta Orthop Scand. 1998;69:116-118.
121. Vlodavsky I, Flokman J, Sullivan R.:
Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition
into subendothelial extracellular matrix.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84:2292-2296.
122. Waksman R.:
Vascular brachytherapy: from investigation to approval.
Cardiovasc Radiat Med. 2001;2:61-62.
123. Weintraub WS, Bocuzzi SJ, Klein JL.:
Lack of effect of lovastatin on restenosis after coronary angioplasty.
N Engl J Med. 1994;331:1331-1337.

124. Wilentz JR, Sanborn TA, Haudenschild CC, Valeri CR, Ryan TJ, Faxon DP.:
Platelet accumulation in experimental angioplasty: time course and relation to
vascular injury.
Circulation. 1987;75:636-642.
125. Winkles JA, Friesel R, Burgess WH, Howk R, Mehlman T, Weinstein R, Maciag
T.:
Human vascular smooth muscle cells both express and respond to heparin-binding
growth factor I (endothelial cell growth factor).
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84:7124-7128.
126. Wolf YG, Rasmussen LM, Ruoslahti E.:
Antibodies against transforming growth factor- β 1 suppress intimal hyperplasia in a
rat model.
J Clin Invest. 1994;93:1172-1178.
127. Wolfort SF, Reicken SR, Berthiaume F, Tomkins RG, Yarmush ML.:
Control of hypertrophic scar growth using antibody targeted photolysis.
J Surg Res. 1996;62:17-22.
128. Yu ZX, Biro S, Fu YM, Sanchez J, Smale G, Sasse J, Ferrans VJ, Casscells W.:
Localization of basic fibroblast growth factor in bovine endothelial cells:
immunohistochemical and biochemical studies.
Exp Cell Res. 1993;204:247-259.

8 Teilpublikationen

Adili F, **Scholz T**, Hille M, Heckenkamp J, Barth S, Engert A, Schmitz-Rixen T

Photodynamic therapy mediated induction of accelerated re-endothelialisation following injury to the arterial wall: implications for the prevention of postinterventional restenosis.

Eur J Vasc Endovasc Surg. 2002 Aug;24(2):166-75.

Scholz T, Adili F, Gathmann S, Barth S, Engert A, Schmitz-Rixen T

Hemmung der Proliferation und autocrinen basic Fibroblast Growth Factor vermittelten Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen nach Photodynamischer Therapie von extrazellulärer Matrix.

Vortrag auf dem Deutschen Chirurgen Kongress 05/2002 mit Veröffentlichung in Langenbeck`s Archiv Supplement 2002

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Die mRNA-Expression von basic Fibroblast Growth Factor und Proliferation glatter Gefäßmuskel- und Endothelzellen nach Photodynamischer Therapie von extrazellulärer Matrix: Implikationen für den Wirkmechanismus einer photodynamischen Hemmung von Intimahyperplasie“

am

Zentrum der Chirurgie Schwerpunkt Gefäß- und Endovascularchirurgie mit Unterstützung der Medizinischen Klinik I der Universität zu Köln

unter der Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. med. Th. Schmitz-Rixen

mit Unterstützung durch PD Dr. med. F. Adili (1), Dr. Stefan Barth (2), Dr. Alexander Klimka (2) und Dr. Thomas Pfitzner (2) [(1) Schwerpunkt Gefäß- und Endovascularchirurgie des Zentrums Chirurgie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, (2) Medizinische Klinik I der Universität zu Köln] ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan teilveröffentlicht:

- *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002;24:166-175.
- *Vortrag* auf dem Deutschen Chirurgen Kongress 05/2002 mit Veröffentlichung in *Langenbecks Archiv Supplement* 2002.

Köln, den 30.03.2003


T. Scholz

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Scholz
Vorname:	Till
Geburtsdatum:	26.08.1973
Geburtsort:	Hüttental
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch

Schulbildung:

1980-1984	Grundschule Gießen-Rödgen
1984-1993	Landgraf-Ludwig Gymnasium, Gießen
06/1993	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife / Abitur


Ausbildung:

09/1993-10/1994	Zivildienst, Johanniter Unfallhilfe, Gießen, Rettungssanitäter
-----------------	-------------------------------------------------------------------

Studium:

10/1994-11/2001	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Köln
03/1997	Physikum
03/1998	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2000	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2001	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/1997	Beginn der Dissertation

Köln, den 30.03.2003


T. Scholz